

Struktur- og aktivitetsstudier på polysakkarider isolert fra *Hypoxis Hemerocallidea*



Sarah S. Hussain

Masteroppgave for graden Master i Farmasi

Avdeling for Farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2010

**Struktur-og aktivitetsstudier på
polysakkarider isolert fra
*Hypoxis Hemerocallidea***

Sarah S. Hussain

Masteroppgave for graden Master i Farmasi

Avdeling for Farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2010

Veileder: Berit Smestad Paulsen

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk kjemi ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo og ved Folkehelseinstituttet i perioden mars 2009 til mai 2010.

Jeg ønsker å takke følgende personer:

- Veilederen min, Professor Berit Smestad Paulsen, for gode faglige diskusjoner, god veiledning og inspirasjon.
- Stipendiatene Tom Erik Grønhaug, Ingvild Austarheim for all hjelp og nyttige diskusjoner.
- Kari Tvette Inngjerdingen for faglig hjelp og utførelse av makrofagtesten.
- Sutajini Yogarajah, Anne Catherine Vesterheim og Atle Haugen for praktisk hjelp på laboratoriet. Finn Tønnesen for analyser av prøver på GC-MS.
- Alle ansatte og hovedfagsstudenter på avdelingen for hyggelig samarbeid og oppmuntring.
- Hele familien for all hjelp med å ha sittet barnevakt for min lille sønn, Hamza. Et stort takk fra hjertet til moren min, Zubaida Begum, for sin tålmodighet, støtte og for å være en fantastisk mor og bestemor.
- Sist, men ikke minst, vil jeg rekke et stort takk til min mann, Moazzam Javid, for motivasjon, for å bringe glede i livet mitt og for å holde meg på sporet. Takk for du er så snill livspartner.

Innholdsfortegnelse

FORORD	3
INNHOLDSFORTEGNELSE.....	4
1. FORKORTELSER.....	8
2. SAMMENDRAG	10
3. INNLEDNING	11
3.1 POLYSAKKARIDER	11
3.2 PLANTECELLEVEGG	12
3.2.1 Struktur og funksjon	12
3.2.2 Cellulose	13
3.2.3 Hemicellulose.....	13
3.2.4 Pektiner	13
3.2.5 Bioaktive pektiner	16
3.3 IMMUNSYSTEMET	17
3.3.1 Immunforsvaret.....	17
3.3.2 Makrofager	17
3.3.3 Komplementsystemet.....	19
3.4 <i>HYPOXIS HEMEROCALLIDEA</i>	21
3.4.1 Taksonomisk klassifisering.....	21
3.4.2 Botanikk og habitat	22
3.4.3 Bruk i tradisjonell og konvensjonell medisin.....	23
3.4.4 Tidligere forskning	24

4. OPPGAVENS MÅLSETTING	29
5. METODER.....	30
5.1 GENERELLE METODER	30
5.1.1 Vannkvalitet	30
5.1.2 Innveiting	30
5.1.3 Filtrering	30
5.1.4 Sentrifugering	30
5.1.5 Blanding av løsninger	30
5.1.6 pH-målinger.....	31
5.1.7 Avgassing/evakuering av luft	31
5.1.8 Volumreduksjon.....	31
5.1.9 Oppkonsentrering med rotavapor	31
5.1.10 Frysetørking.....	32
5.1.11 Absorbansmålinger	32
5.1.12 Syrevask av glassutstyr	33
5.1.13 Dialyse.....	33
5.1.14 Ultrafiltrering	36
5.2 ISOLERING AV POLYSAKKARIDER	37
5.2.1 Ekstraksjon med diklormetan og metanol	37
5.2.2 Ekstraksjon med 50 % etanol.....	39
5.2.3 Ekstraksjon med vann	40
5.2.4 Ionebytterkromatografi.....	42
5.2.5 Gelfiltrering	45
5.3 KVALITATIV OG KVANTITATIV BESTEMMELSE AV KARBOHYDRATINNHold	49

5.3.1 Fenol-svovelsyretesten	49
5.3.2 Monosakkaridbestemmelse.....	51
5.4 STRUKTUROPPLARING.....	56
5.4.1 Molekylvektsbestemmelse.....	56
5.4.2 Enzymatisk degradering.....	59
5.4.3 Metylering	60
5.4.4 GC-MS	69
5.5 IMMUNMODULERENDE AKTIVITET.....	70
5.5.1 Komplementfikseringstest.....	70
5.5.2 NO-frigjøring fra makrofager	74
6. RESULTATER OG DISKUSJON	77
6.1 ISOLERING AV POLYSAKKARIDER	77
6.1.1 Ekstraksjon.....	78
6.1.2 Ionebytterkromatografi	78
6.1.3 Gelfiltrering med Sephacryl S-200.....	80
6.2 STRUKTUROPPLARING.....	83
6.2.1 Monosakkaridanalyse.....	83
6.2.2 Bindingsforhold	86
6.2.3 Molekylvektsdistribusjon.....	90
6.3 BIOLOGISK AKTIVITET	94
6.3.1 Komplementfikseringstest.....	94
6.3.2 NO-frigjøring fra makrofager	99
6.4 STRUKTUROPPLARING ETTER ENZYMATISK DEGRADERING	100
6.4.1 Gelfiltrering med PD-10 kolonne.....	100

6.4.2 Monosakkaridanalyse	101
6.4.3 Bindingsforhold	103
6.4.4 Komplementfikseringstest	105
6.5 VIDERE STUDIER	107
7. KONKLUSJON	108
KILDELISTE.....	110

1. Forkortelser

Ac	Acetylgruppe
Ara	Arabinose
AG-I	Arabinogalaktan type I
AG-II	Arabinogalaktan type II
b	Bredde
BSA	Bovine serum albumin
d	Diameter
Da	Dalton
<i>f</i>	Furanoseform
FHI	Folkehelseinstituttet
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FS-test	Fenol-svovelsyretest (metode 5.3.1)
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi koblet med massespekter
GI-traktus	Gastrointestinal-traktus
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
h	Høyde
ICH ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % hemming av hemolyse
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysakkarid
m/z	Masse- og ladningsforholdet til et ion i MS-spekter
Me	Metylgruppe
Mw	Molekylvekt
Rha	Rhamnose
rpm	Rotasjoner per minutt
PMII	<i>Plantago major</i> L. Fraksjon 2 fra bladene
RG-I	Rhamnogalakturonan type I

RG-II	Rhamnogalakturonan type II
T	Terminal
TNF	Tumor nekrose faktor
UV	Ultrafiolett

Polysakkaridfraksjoner isolert fra *H. hemerocallidea*

50GradFI	Sur fraksjon I etter separasjon av 50 °C vannekstrakt på ionebytter
50GradFII	Sur fraksjon II etter separasjon av 50 °C vannekstrakt på ionebytter
50GradFIII	Sur fraksjon III etter separasjon av 50 °C vannekstrakt på ionebytter
100GradFI	Sur fraksjon I etter separasjon av 100 °C vannekstrakt på ionebytter
100GradFII	Sur fraksjon II etter separasjon av 100 °C vannekstrakt på ionebytter
100Salt	Separasjon av 100 °C vannekstrakt på ionebytter, eluert med 2 M NaCl
100Nøytral	Nøytral fraksjon etter separasjon av 100 °C vannekstrakt på ionebytter
100GradFIa	Fraksjon a etter separasjon av 100GradFI på Sephacryl S-200 kolonne
100GradFIb	Fraksjon b etter separasjon av 100GradFI på Sephacryl S-200 kolonne
100GradFIIa	Fraksjon a etter separasjon av 100GradFII på Sephacryl S-200 kolonne
100GradFIIb	Fraksjon b etter separasjon av 100GradFII på Sephacryl S-200 kolonne
100GradFIIc	Fraksjon c etter separasjon av 100GradFII på Sephacryl S-200 kolonne
100GradFIaz	Fraksjon 100GradFIa behandlet med arabinofuranosidase
100GradFIbz	Fraksjon 100GradFIb behandlet med arabinofuranosidase
100GradFIIbz	Fraksjon 100GradFIIb behandlet med arabinofuranosidase

2. Sammendrag

Hypoxis Hemerocallidea har i århundrer vært en del av tradisjonell medisin i det sørlige Afrika. Det er hovedsakelig rotknollen som brukes i medisinsk sammenheng deriblant mot blæreforstyrrelser, benign prostata hypertrofi og i tradisjonell styrkemiddel. Rotknollen brukes også mot immunrelaterte sykdommer som forkjølelse, artritt, psoriasis, kreft og HIV/AIDS. Da tidligere studier har knyttet polysakkarider i planter til immunmodulerende aktivitet, har man sett muligheten for å finne liknende aktivitet i polysakkarider fra *H. hemerocallidea*.

Jordknollen fra *H. hemerocallidea* ble ekstrahert med diklormetan og metanol.

Polysakkaridene ble deretter ekstrahert ut med etanol og 50- og 100 °C vann.

Polysakkaridene i disse tre ekstraktene ble separert på ionebytterkolonne, og eluatene ble delt opp i sure og nøytrale fraksjoner. Av fraksjonene etter ionebytter viste 100Nøyt, EtOHNøyt, 100GradFI og 100GradFII høyest aktivitet på komplementfikseringstesten. På bakgrunn av mengde karbohydrat, mengde stoff og komplementfikserende aktivitet ble det valgt å gå videre med 100GradFI og 100GradFII. Disse to ble rensset ytterligere på gelfiltreringskolonne, med påfølgende fraksjoner: 100GradFIa, 100GradFIb, 100GradFIIa, 100GradFIIb og 100GradFIIc. Alle disse fem viste høy aktivitet (100GradFIa, 100GradFIb og 100GradFIIb var de mest aktive) på komplementfikseringstesten. De tre sistnevnte fraksjonene ble testet på makrofager, og alle hadde nokså lav effekt på makrofager.

Det ble bestemt monosakkaridsammensetning på følgende fraksjoner: 50GradFI, 50GradFII, 50GradFIII, EtOHNøyt, EtOHGrad, 100Salt, 100Nøyt, og alle fem fraksjoner derivert fra 100GradFI og 100GradFII. Disse hadde høyt monosakkaridinnhold, og indikerte nærvær av pektiner. Bindingsforholdene i 100GradFIa, 100GradFIb, 100GradFIIa, 100GradFIIb og 100GradFIIc ble analysert. Disse fem hadde noe arabinan og små mengder RG-I. De hårete områdene hadde få forgreningspunkter. Det ble funnet ulik grad av RG-II i disse fem prøvene. Man antar at alle fem prøvene inneholder AG-I og AG-II, og mengden av glatte områder er betydelig i alle fem fraksjonene analysert på GC-MS. 100GradFIa, 100GradFIb og 100GradFIIb ble enzymdegradert, og fikk betydelig reduksjon i komplementfikserende aktivitet. Trolig bidrar AG-I og AG-II til bioaktiviteten i 100GradFIa. Det er mulig at arabinan i 100GradFIIb bidrar til denne fraksjonens antikomplementære effekt.

3. Innledning

3.1 Polysakkarider

Polysakkarider er veldig utbredt i naturen, og har mange allsidige funksjoner. I plantevev fungerer de blant som energireservoar (stivelse og glykogen) og strukturenheter (cellulose og pektin). Polysakkarider er en heterogen gruppe av polymerer som kan være linære eller forgrenete. Et stort antall av monosakkarider er bundet ved hjelp av glykosidbindinger, og danner et polysakkarid. Graden av polymerisering, som bidrar til polysakkaridenes høye molekylvekt, kan ha stor variasjon og bestemmes av antall monosakkarider. Løseligheten til polysakkarider påvirkes av deres kjemiske sammensetning, molekylstruktur og molekylvekt (Izydorczyk 2005).

Denne polymeren deles inn i to grupper; homopolysakkarider, bestående av en type monosakkarider, og heteropolysakkarider som består av to eller opptil ti ulike monosakkarider. Konfigurasjonen og posisjonen til glykosidbindingene, i tillegg til de ulike monosakkaridene og deres rekkefølge, gir en enorm variasjon i strukturen til polysakkarider. Dessuten kan polysakkarider ha sure eller nøytrale monosakkarider som kan være substituert med ulike organiske grupper som metyl- og acetylgrupper (Izydorczyk 2005).

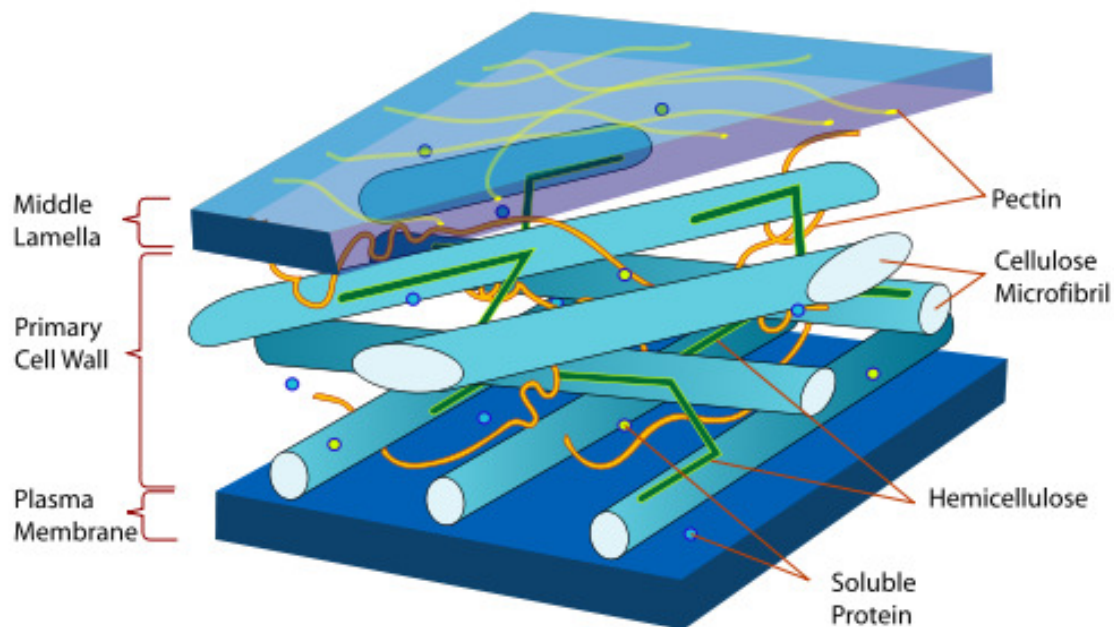
Det er rapportert at flere polysakkarider fra planter er involvert i modulering av immunsystemet og påvirker komplementsystemet, lymfocytt proliferering, antistoff produksjon, makrofag funksjon og intestinal immunitet. Polysakkarider isolert fra plantemedisin har vist farmakologiske effekter som blant annet immunstimulerende aktivitet, antiulcer aktivitet, antimetastase aktivitet, apoptose induserende aktivitet for kreftceller, hypoglykemisk effekt og kolesterolsenkende effekt (Yamada og Kiyohara 2007).

3.2 Plantecellevegg

3.2.1 Struktur og funksjon

I motsetning til dyreceller er planteceller omsluttet av en tynn, men mekanisk sterk cellevegg. Denne celleveggen er bygd opp av et organisert nettverk av polysakkarider og andre polymerer. Andre komponenter i plantecelleveggen er strukturelle proteiner, enzymer, fenoliske polymerer og annet materiale som modifiserer celleveggens fysikalsk- kjemiske egenskaper. Celleveggens funksjon er blant annet å tilføre mekanisk styrke til plantestrukturene, "lime" cellene sammen og beskytte mot patogener (Taiz og Zeiger 2006).

Celleveggen hos planter (figur 3.1) består av tre deler; primær cellevegg, sekundær cellevegg og midtlamella. Den førstnevnte dannes av voksende celler, og sammensetningen kan ha stor variasjon. Primær cellevegg inneholder polysakkaridene cellulose, hemicellulose og pektiner, og noe proteiner. Den sekundære celleveggen lages når celleveksten er ferdig. Denne delen av celleveggen er tykk, består av flere lag og oppbygningen er forskjellig fra primær cellevegg. Midtlamenlla er et tynt lag som skiller seg fra resten av celleveggen ved at den inneholder mye pektiner og proteiner forskjellig fra resten av veggen (Taiz og Zeiger 2006).



Figur 3.1 Oppbygning av plantecelleveggen (Wikipedia 2010).

3.2.2 Cellulose

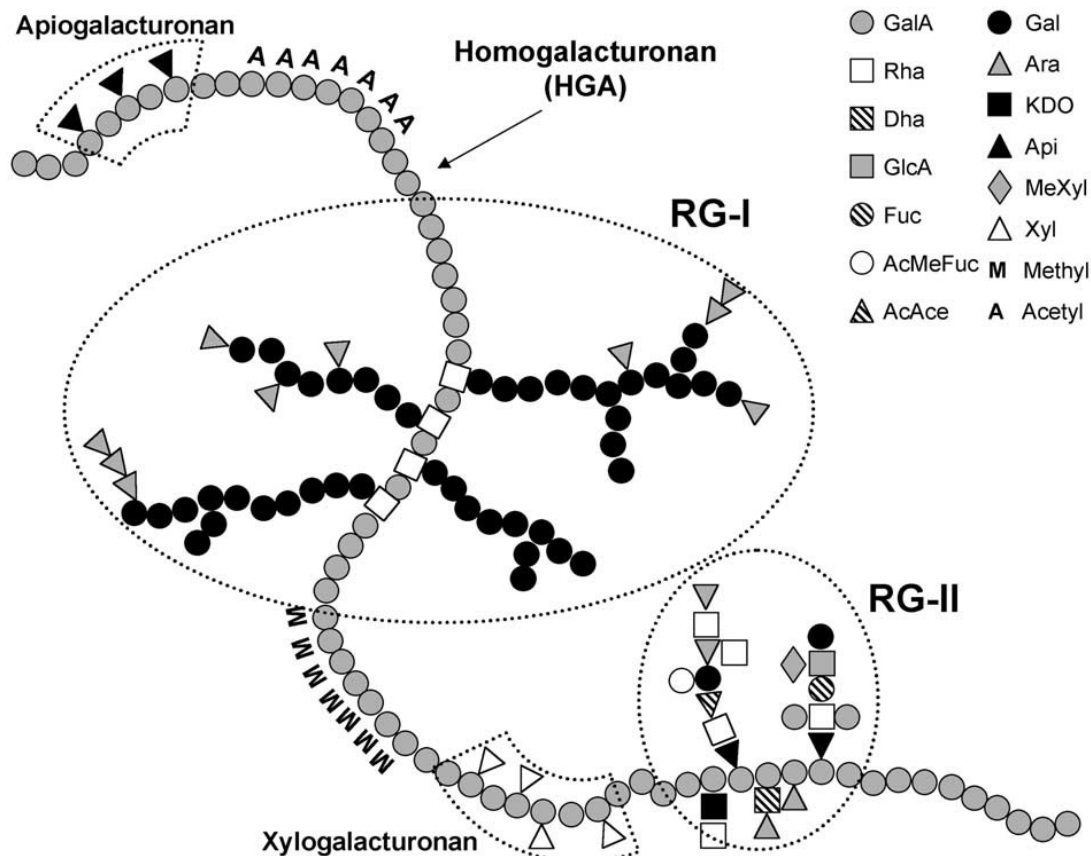
Cellulose er hovedkomponenten i celleveggen til de fleste planter, og gjør at cellen blir rigid. Denne polymeren, som er en uforgrenet homopolysakkarid, består av β -1 \rightarrow 4-glukose enheter. Flere cellulosemolekyler holdes sammen ved hjelp av hydrogenbindinger og Van der Waals krefter, og danner en micelle som igjen danner mikrofibriller. Disse kan igjen grupperes til makrofibriller. Celleveggen inneholder et nettverk med cellulosefibriller (Samuelsson og Bohlin 2009, Aarnes 2000).

3.2.3 Hemicellulose

Hemicellulose er en heterogen gruppe av polysakkarider som er sterkt bundet til celleveggen. Denne typen sukker binder seg til overflaten til cellulose og danner et nettverk av cellulose mikrofibriller. Hemicellulose kalles også for kryssbindende glykaner. Det finnes flere typer hemicellulose i plantecellevegg, og sammensetningen av dem varierer i ulike vev og arter. I primær cellevegg er det mest av hemicellulosen xyloglukan, og i sekundær cellevegg er det lite xyloglukaner men mer av xylaner og glukomannaner (Taiz og Zeiger 2006).

3.2.4 Pektiner

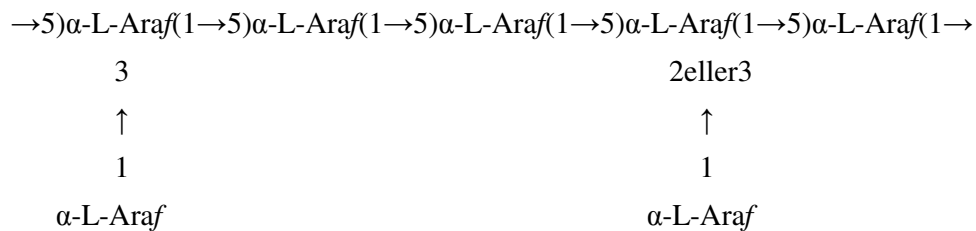
Pektiner har mange funksjoner i plantecellevegg, blant annet regulering av ionetransport, vannretensjon og deltar i forsvarsmekanismer mot infeksjoner fra plante patogener, sår og stress (Schols og Voragen 2002). I likhet med hemicellulose er pektiner en heterogen gruppe av polysakkarider. Pektiner består av sure sukkere som galakturonsyre og nøytrale sukkere som rhamnose, galaktose og arabinose. Av alle polysakkarider i celleveggen er pektiner mest vannløselige. Pektiner i celleveggen er høymolekylære og komplekse forbindelser som er sammensatt av ulike grupper bundet sammen med kovalente og ikke-kovalente bindinger. Figur 3.2 viser oversikt over primære pektinstrukturer. Hovedkjeden, homogalakturonan, består av α -1 \rightarrow 4-D-galakturonsyre-enheter som kan være metylert ved C6 og/eller O-acetylt. På hovedkjeden, også kalt "smooth region" eller glatt område, er det bundet rhamnogalakturonan type I, arabinogalaktan type I og II, og enkelte pektiner kan også inneholde rhamnogalakturonan type II (Taiz og Zeiger 2006).



Figur 3.2 Oversikt over primære pektinstrukturer (Perez et al 2003).

Arabinaner

Arabinaner i planter består hovedsakelig av α -L-1 \rightarrow 5-arabinofuranosider, og avhengig av opprinnelsen kan de være linære eller forgrenete. Som figur 3.3 viser er hovedkjeden C5-bundet, og forgreninger kan være på C2 eller C3. I naturen kan arabinaner ha en annen form, mest sannsynlig er de bundet til galaktaner på pektinkompleks. Ved hjelp av enzymer (blant annet i plantecellevegg) eller svak syrehydrolyse kan arabinaner frigjøres fra dette komplekset (Paulsen og Barsett 2005).



Figur 3.3 Foreslått struktur av en del av et arabinan (Paulsen og Barsett 2005).

Arabinogalaktan type I og II (AG-I og AG-II)

Arabinogalaktan type I finnes i ulik grad i plantecelleveggen, og består av β -1,4 bundet galaktan ryggrad med sidekjeder av arabinaner bundet hovedsakelig på C3, og noe på C5, på galaktose enhetene (Paulsen og Barsett 2005).

AG-II er mer vanlige i planter enn AG-I, og finnes i blant annet blader, røtter, blomster og frø. Arabinogalaktan type II er høyt forgrenete polysakkarider med en indre kjede bestående av β -1 \rightarrow 3-bundet galaktose og en ytre kjede av β -1 \rightarrow 6-galaktopyranose-enheter. Den førstnevnte kan være forgrenet gjennom O-6 med arabinofuranose-enheter eller med arabinopyranose-enheter, i tillegg kan det også være lengre kjeder av α -1 \rightarrow 3-bundet arabinose kjeder (Schols og Voragen 2002). Både AG-I og AG-II kan være en del av RG-I, de er bundet via posisjon 4 på rhamnose-enhetene av pektin-komplekset (Paulsen og Barsett 2005).

Rhamnogalakturonan type I (RG-I)

RG-I har en kjerne av alternerende α -1 \rightarrow 4 bundet D-galakturonsyre og α -1 \rightarrow 2-L-rhamnose, med forgreninger på rhamnose-enhetene (på posisjon 3 og 4). Sidekjedene kan være arabinan og galaktan-enheter. Arabinogalaktanene som det er mest av i RG-I er AG-II. RG-I kalles også for "hairy region", "ramified region" eller hårete område (Paulsen og Barsett 2005).

Rhamnogalakturonan type II (RG-II)

Rhamnogalakturonan type II er kryssbundet i plantecelleveggen med boratdiester, og denne kryssbindingen er essensiell for struktur og mekanisk styrke av celleveggen (Taiz og Zeiger 2006). RG-II er en kompleks struktur som finnes i den primære celleveggen i mange planter. Denne polymeren fikk det noe misvisende navnet før hele strukturen var oppklart. RG-II har en såkalt homogalakturonan ryggrad av 9-10 D-galakturonsyre enheter som er α -1 \rightarrow 4 bundet, og med fire ulike kjeder av oligosakkarider knyttet i posisjon 3 eller 4 på uronsyre-kjernen. Det karakteristiske trekket ved RG-II er innholdet av sjeldne sukkere som blant annet 2-O-metylfukose, 2-O-metylxylose og apiose (Paulsen og Barsett 2005).

3.2.5 Bioaktive pektiner

In vitro og *in vivo* tester av ulike polysakkarider har vist immunologiske effekter, men man vet lite om struktur- og aktivitetsforhold. Polysakkarider med antikomplementær aktivitet viser også andre farmakologiske aktiviteter, og deres immunstimulerende aktivitet er på en eller annet måte knyttet til deres antikomplementær effekt. Med all forskning som er gjort på polysakkarider kan det konkluderes med at polysakkarider interfrerer med komplementsystemet og/eller cytokin-frigjøring (Yamada og Kiyohara 1999). Polysakkarider med immunstimulerende aktivitet øker fagocytose, aktiverer komplement eller har antitumor aktivitet. Ulike polysakkarider har forskjellig virkningsmekanisme i immunsystemet, dermed er det vanskelig å bestemme struktur- og aktivitetsforhold. De fleste aktive polysakkarider er høyt forgrenete med Mw i området 20 kDa til 50 kDa. De fleste av de aktive polysakkaridene er derivert fra primær cellevegg og har pektin struktur (Yamada og Kiyohara 1999).

Det er vist at sure polygalakturonanstrukturer med arabinogalaktan-sidekjeder har potent komplementaktiverende aktivitet. Farmakologisk aktive pektiner inneholder blant annet RG-II. Det tenkes at komplementaktiviteten til pektiner hovedsakelig skyldes de hårete områdene, og at aktiviteten kan skyldes en kombinasjon av rhamnogalakturonan-kjerne og de nøytrale sidekjedene. Man tenker seg at det er bestemte nøytrale sidekjeder i hårete områder som kan være ansvarlig for biologisk aktivitet. Mange pektiner med komplementfikserende aktivitet har i tillegg vist mitogen B-celleaktivitet. Man tenker seg at de forgrenete områdene, spesielt de hårete områdene, kan være ansvarlig for denne effekten (Yamada og Kiyohara 1999). Flere studier på polysakkarider fra høyere planter viser at denne polymeren har aktiverende effekt på makrofager. Polysakkarider er vist å øke makrofagers cytotoksiske aktivitet mot tumorceller og mikroorganismer, aktiverer fagocytisk aktivitet, øker produksjon av ROS (reaktive oksygenspecier) og NO (nitrogen oksid), og øker sekresjon av cytokiner og kjemokiner, som TNF- α og ulike interleukiner. Polysakkarider derivert fra planter har i tillegg vist å indusere makrofag hematopoiese (Schepetkin og Quinn 2006).

Paulsen og Barsett (2005) tok for seg 20 planter som tradisjonelt brukes mot ulike sykdommer hvor immunsystemet er involvert, og beskriver bioaktive pektiner fra disse plantene. De fleste aktive pektinene hadde AG-I og AG-II sidekjeder bundet til RG-I. Da ikke alle pektiner som inneholder AG-II utviser effekt på komplementsystemet, må det være

andre faktorer knyttet til deres posisjon på polymeren som er av betydning. Pektin som inneholder RG-II har ulike biologiske effekter i immunologiske testsystemer. Mens homogalakturonan-områdene har modulerende/nedregulerende effekt på den immunmodulerende aktiviteten (Paulsen og Barsett 2005).

3.3 Immunsystemet

3.3.1 Immunforsvaret

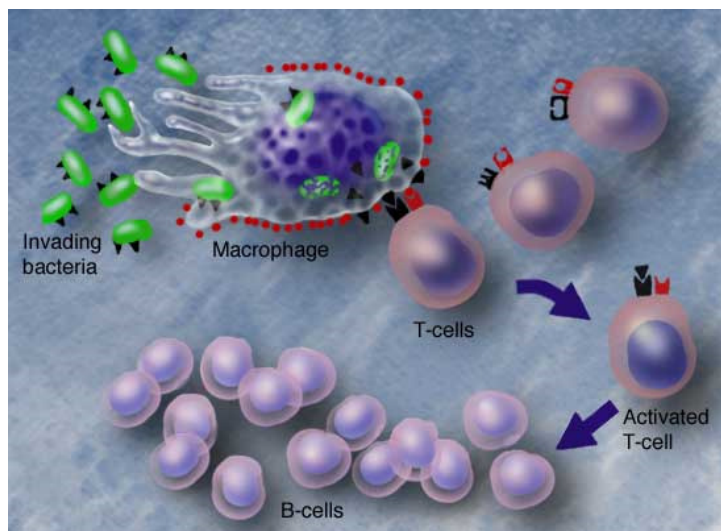
Kroppens første forsvar mot infeksjoner er den impermeable huden, og slimhinner som beskytter epitelceller mot skade og er med på å begrense infeksjon. Når et patogen kommer gjennom disse fysiske og kjemiske barrierene, aktiveres den indre delen av immunforsvaret bestående av medfødt og adaptiv immunforsvar. Ved en infeksjon startes det først med den medfødte, uspesifikke immunresponsen. Denne er rask og effektiv mot de fleste infeksjoner i tidlig fase. Denne delen av immunforsvaret har ulike elementer; cytotoksiske celler, fagocytiske celler og forskjellige typer proteiner deriblant komplement (Parham 2009).

Hvis det medfødte immunforsvaret mislykkes i å stoppe en infeksjon, settes den adaptive, spesifikke immunresponsen i gang. Selv om den er tregere, er den desto mer kraftig. I motsetning til det medfødte immunforsvaret som har destruksjon som sitt hovedområde, er oppgaven til det ervervede immunforsvaret å gjenkjenne patogener. T-og B-lymfocytter har evnen til å gjenkjenne et stort spekter av potensielle patogener. Hvert individuell T-og B-lymfocyt har sine overflatereseptorer som gjenkjenner et spesifikt patogen eller dets deler. Deretter startes produksjon av blant annet "hukommelsesceller" som husker antigenet som ble gjenkjent av lymfocytten. Neste gang det samme antigenet kommer inn i kroppen reagerer hukommelsescellene raskt og kraftig, og gir dermed en livslang immunitet mot spesifikke patogener (Parham 2009).

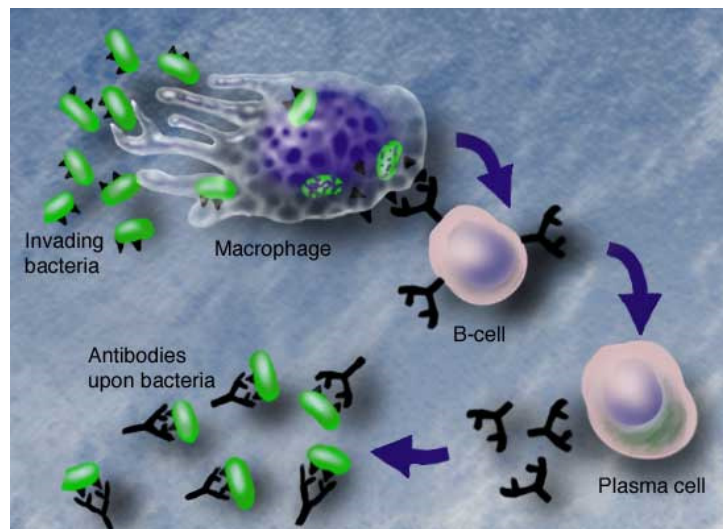
3.3.2 Makrofager

Makrofager er differensiert fra monocytter som er spesialiserte hvite blodceller dannet i benmargen. Når monocyttene forlater blodstrømmen og kommer til vev, modnes de til makrofager. I nesten alle vev og organer kan man finne makrofager, som også kalles for

fagocytter. Makrofager gjenkjenner og fjerner gamle, skadete og døde celler, og store mikroorganismer ved hjelp av fagocytose og sekresjon av toksiske kjemikalier. Dessuten skiller de også ut cytokiner og andre faktorer (interleukin-1, TNF, kjemokiner, etc.) som er involvert i kroppens forsvarsmekanismer og inflammasjon. Makrofager er antigenpresenterende celler ved at de setter antigen på sine overflate-proteiner, og dette proteinkomplekset bindes til reseptorer på T_H -celler (T-hjelpeceller). Denne koblingen, i tillegg til andre ikke-spesifikke interaksjoner mellom T_H -celle og makrofagen, fører til aktivering av T_H -cellen som prolifererer og frigjør vekstfaktorer som stimulerer B-lymfocytter til å produsere antistoff (figur 3.4). Når en naiv T_H -celle aktiveres av en antigenpresenterende celle, vil den differensieres til T_H -1 eller T_H -2celle. Makrofager kan også reagere direkte med B-celler som vist på figur 3.5. Reaksjonsmekanismene rundt makrofager er et godt eksempel på hvordan det spesifikke og det upesifikke immunforsvaret interagerer med hverandre (Widmaier et al 2008).



Figur 3.4 Interaksjon mellom makrofag og T-celle som blir aktivert og påvirker B-celler (Maaske 2000).



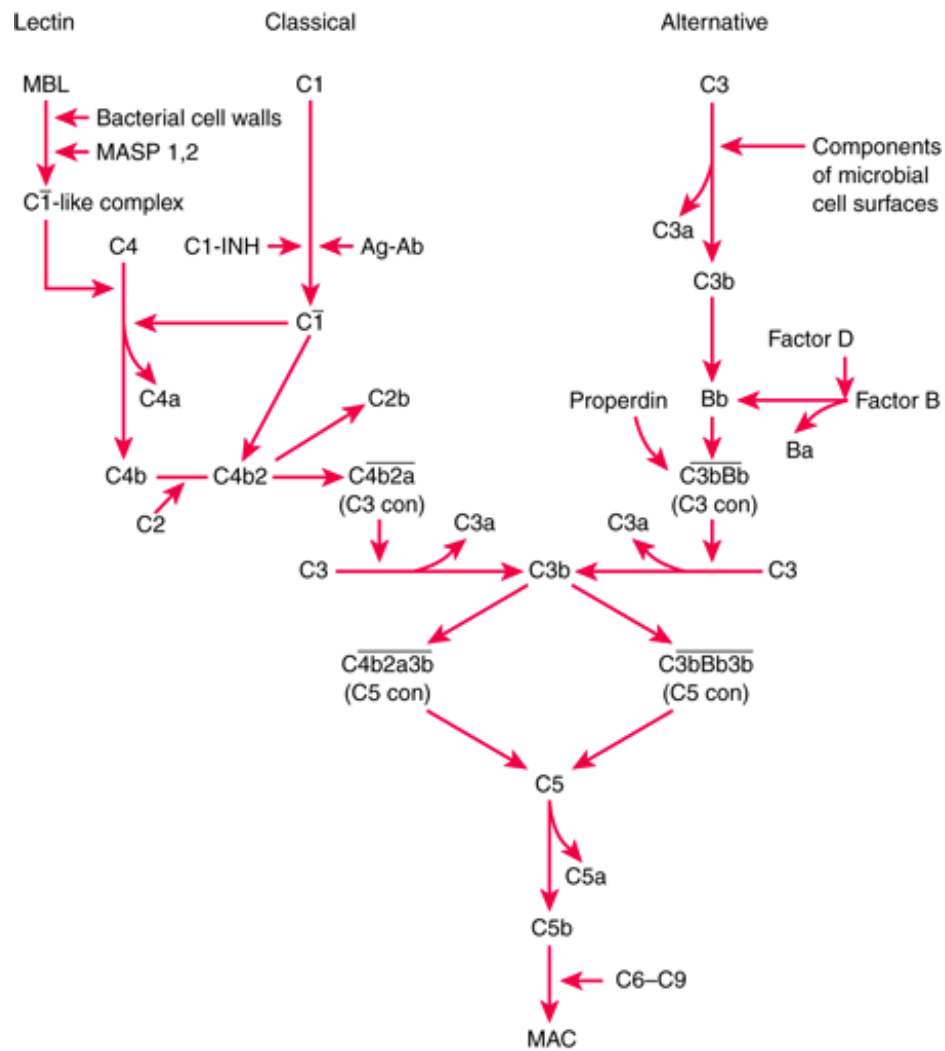
Figur 3.5 Samarbeid mellom makrofag og B-celle som resulterer i dannelsen av antistoffer mot mikroorganismen som makrofagen fagocyterte (Maaske 2000).

3.3.3 Komplementsystemet

Komplementsystemet er en essensiell del av både det medfødte og det ervervede immunforsvaret. Dette systemet består av glykoproteiner i ekstracellulær matriks, inkludert ni komplementkomponenter (C1-C9) og deres regulatorer, og er normalt i inaktiv form. Når denne delen av immunforsvaret aktiveres, startes en rekke kaskader som gir protolytisk kløyving og aktivering av komplementproteiner. Det blir dannet biologisk aktive komplementfragmenter som mobiliserer leukocytter for kjemotakse, øker lokal vaskulær permeabilitet, modulerer antistoffproduksjon, etc. Dermed bidrar komplementaktivering til inflammatoriske responser i tillegg til immunologiske forsvarsmekanismer for eksempel aktivering av makrofager og lymfocytter og regulering av antistoffproduksjon (Yamada og Kiyohara 1999).

Komplementproteinene aktiveres via tre kjedereaksjoner (se figur 3.6); klassisk vei, lektin vei og alternativ veien. Den førstnevnte kaskaden startes ved at C1 bindes til reseptorer på immunkomplekser, bestående av IgM og IgG antistoff. Lektin veien settes i gang ved binding av antistoff uavhengig mannanbindende lektin til overflaten på karbohydrater. Denne veien aktiveres av spesifikke karbohydratstrukturer tilhørende bakterier, sopp, protozoer og virus. Lektin veien utviser antibakteriell aktivitet ved at komplementkomponenter gir lyse eller fremmer fagocytose. Alternativ vei aktiveres, direkte fra C3, av mikroorganismer, protozoer eller LPS gjennom antistoff uavhengig mekanisme. Alle tre veiene ender med sluttproduktet,

MAC (Membrane Attack Complex), som gir lyse. Alternativ og lektin veien bidrar til forsvarsmekanismer i den medfødte immunresponsen (Yamada og Kiyohara 1999).



Figur 3.6 Komplementaktivering via klassisk, alternativ og lektinvei (Delves 2008).

3.4 *Hypoxis hemerocallidea*



Figur 3.7 *Hypoxis hemerocallidea* (Singh 2004)

3.4.1 Taksonomisk klassifisering

Rike:	Plantae
Divisjon:	Magnoliophyta
Klasse:	Liliopsida
Orden:	Asparagales
Familie:	Hypoxidaceae
Slekt:	Hypoxis
Art:	Hemerocallidea

(Bisby et al 2009)

3.4.2 Botanikk og habitat

Språk	Lokale navn
Afrikaans	Sterblom
Engelsk	Star-flower, kallenavn "African potato"
Sotho	Lotsane, moli-kharatsa
Zulu	Ilabatheka, inkomfe

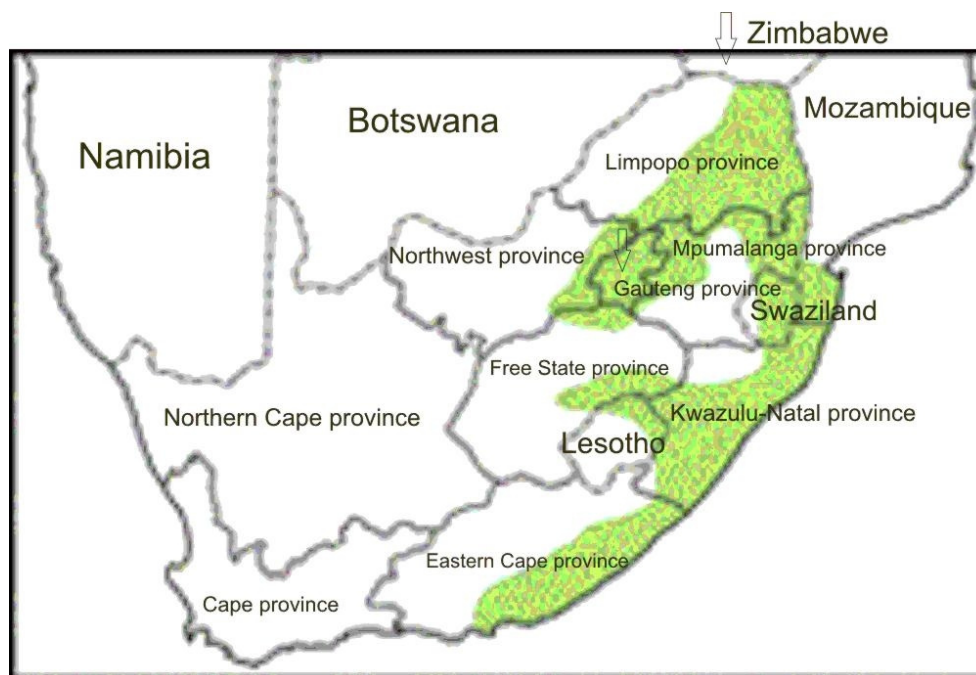
Tabell 3.1 *H. hemerocallidea* på ulike språk (Matsabisa 2006, Van Wyk 2009).

H. hemerocallidea (Fisch. & C.A. Mey) ble tidligere også kalt *H. rooperi* (tabell 3.1 viser lokale navn på planten). Det misvisende kallenavnet "afrikansk potet" kommer av at den underjordiske delen av planten er potetlignende rotknoll. Denne flerårige planten har brede, stroppeformete og noe hårete blader som vokser over hverandre. Bladene er 30 cm lange og 3,2 cm brede, og danner tre tydelige grupper som sprer seg utover fra den midtre del av planten. Blomstene er gule og stjerneformete (se figur 3.7). De blomstrer fra oktober til januar, og bæres av tynne stilker. Rotknollen (figur 3.8) er 60 mm (opptil 25 cm) i diameter. Den er mørkebrun eller svart på utsiden, og er gul på innsiden når den er ferskt kuttet. Den indre gulfargen blir raskt mørkt ved eksponering for luft, og det kan observeres klebrig harpiksaktig gul juice fra området som er kuttet. På rotknollen er det tynne frynsete sekundær røtter (Matsabisa 2006, Van Wyk 2009).



Figur 3.8 Jordknollen til *H. hemerocallidea* (Chennells 2005).

H. hemerocallidea vokser på gressmarkene i det sørlige Afrika. Som figur 3.9 vokser den på følgende provinser i Sør-Afrika: Eastern Cape Province, KwaZulu-Natal, Mpumalanga, Limpopo Province, Northwest Province, Free State Province og Gauteng. I tillegg kan man finne denne planten på Swaziland, Lesotho, Mosambik, Zimbabwe og Botswana (Matsabisa 2006, Singh 2004, Drewes og Elliot 2008).



Figur 3.9 Det grønne området viser en del av distribusjonsområdet til *H. hemerocallidea* (Matsabisa 2006).

3.4.3 Bruk i tradisjonell og konvensjonell medisin

I tradisjonell medisin blir det laget vandige avkok, infusjoner og juice av røttene til *H. Hemerocallidea* (Matsabisa 2006). I tradisjonell medisin kokes denne planten i 20 minutter, og tilsvarende en daglig dose på 250 ml fra ca. 20 g ferskt rotknoll fra planten (Nair et al 2007). Avkok og infusjoner tas oralt mens juicen blir påført eksternt på brannsåre (Matsabisa 2006). I Lesotho påføres sevj fra roten lokalt ved hodepine. Avkok av jordknollen benyttes også som styrkedrikk til svake barn hos blant annet Tswana- og Kwena-folket i det sørlige Afrika. I Transkei i Sør-Afrika brukes avkok av de underjordiske delene, oralt eller som klyster, hos pasienter som ikke kan snakke (muligens grunnet sjokk). I sørlige Afrika brukes varmt vandig ekstrakt av jordknollen symptomatisk mot benign prostata hypertrofi (Hutchings 1996). Infusjoner av røttene brukes mot kvalme, blæreforstyrrelser og sinnssykdom.

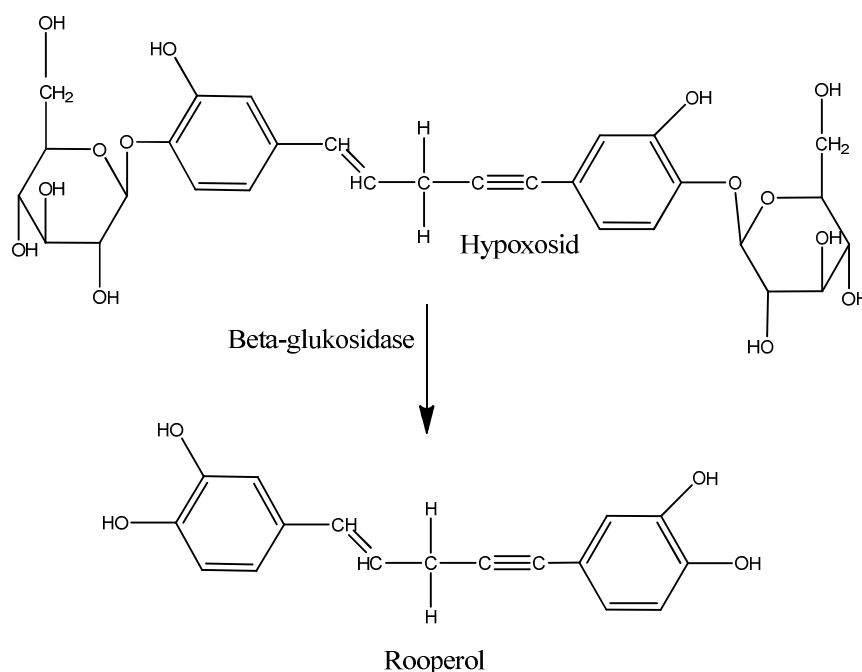
Stammen og bladene, i tillegg til andre ingredienser, brukes for å behandle prostata problemer (Van Wyk 2009).

Tradisjonelle Zulu-healere har brukt *H. Hemerocallidea* i århundrer mot urinveisinfeksjon, tumor og sentralnervøse lidelser som epilepsi og kramper hos barn. I tillegg brukes denne planten ved hyperglykemi i tradisjonell medisin. Rotknollen brukes også for immunrelaterte sykdommer som forkjølelse, artritt, psoriasis, kreft og HIV/AIDS (Mills et al 2005, Ojewole 2008). Selv om *H. Hemerocallidea* er en velkjent medisinsplante for Sotho- og Zulu-folket i Afrika er tradisjonell kunnskap knyttet til denne planten lite dokumentert. I Sør-Afrika brukes denne planten hovedsakelig for å behandle blæreforstyrrelser, svimmelhet, sinnssykdom, tradisjonell styrkemiddel og ved prostata hyperplasi. Svake infusjoner og avkok av røttene tas som styrkemiddel ved tuberkulose og kreft. I tillegg brukes den som laksativ og ormdrivende middel (Van Wyk 2008). En annen bruksområde til denne planten er før fødselen for å hindre truende-, prematur- eller spontanabort (Nyinawumuntu et al 2008). Videre kan det nevnes at planten brukes mot hypertensjon, kardiale sykdommer, impotens, mareritt, angst, ufruktbarhet, intestinale parasitter og mage- og duodenale sår (Ojewole 2008, Drewes og Elliot 2008).

Helsedepartementene i flere afrikanske nasjoner fremmer for tiden bruk av tradisjonell medisin ved HIV og symptomer knyttet til denne sykdommen. I Sør-Afrika fremmer helsedepartementet aktivt bruk av blant annet *H. Hemerocallidea* i kombinasjon med antiretroviral behandling. En av hovedplantene brukt ved HIV/AIDS i områdene sør for Sahara er *Hypoxis Hemerocallidea*. I Sør-Afrika brukes denne planten nå i primær helsetjeneste som immunstimulerende for HIV/AIDS-pasienter. En daglig dose på 2,4 g av råplanten tenkes å være terapeutisk effektiv (Mills et al 2005).

3.4.4 Tidligere forskning

En viktig komponent i planten er nor-lignan glykosidet hypoxosid som i tykktarmen omdannes av β -glukosidase til aglykonet rooperol (se figur 3.10) som er en bioaktiv dikatekol. Metabolittene til rooperol omdannes tilbake til rooperol av dekonjugerende enzymer. I tillegg inneholder planten en rekke steroler (β -sitosterol, stigmasterol), deres glykosider (β -stioserol glykosid) og stanoler (slik som sitostanol) (Mills et al 2005, Laporta et al 2007, Drewes og Elliot 2008).



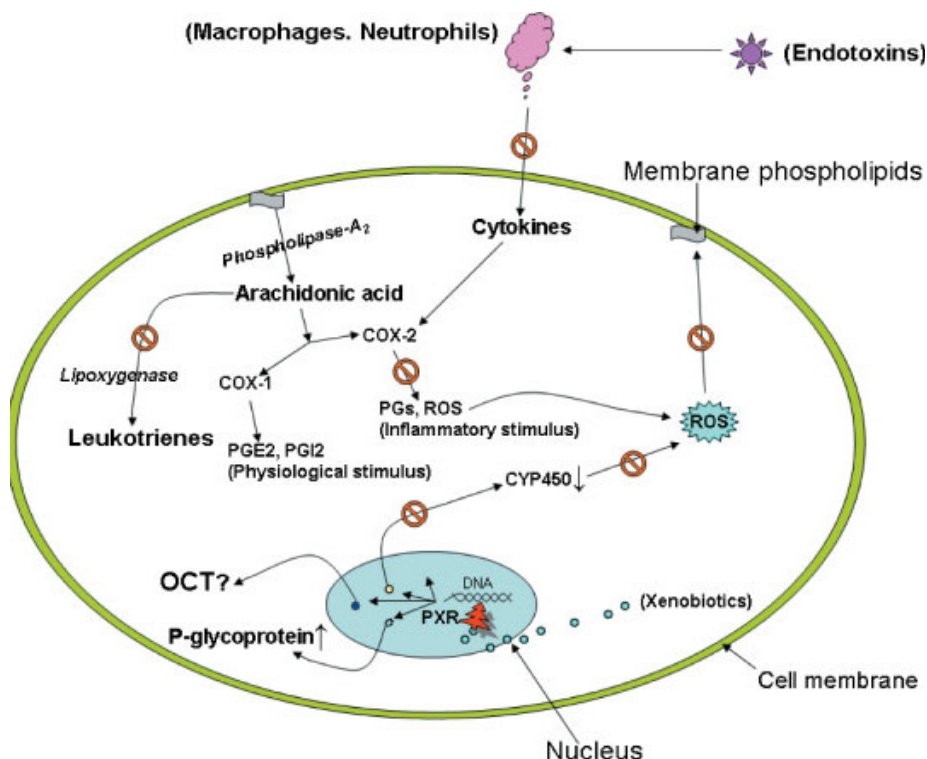
Figur 3.10 Dannelse av rooperol fra hypoxosid (Albrecht et al 1995).

Det er rapportert at *H. hemerocallidea* inneholder opp til 4,5 % hypoxoside, og at rotknollen til planten inneholder mesteparten av denne forbindelse (Bayley og Staden 1990). Verken kliniske eller toksiske studier har vist toksisitet av *H. hemerocallidea*-ekstrakter eller hypoxosid (Laporta et al 2007). Metabolittene til rooperol er non-toksiske i høye konsentrasjonen i vevskulturer (Albrecht et al 1995). Moderate til høye doser av ekstrakt av *H. hemerocallidea* (≥ 400 mg/kg) forårsaket doserelatert sedasjon og søvnighet i mus (Ojewole 2008). I en studie på rotter har man funnet at kronisk behandling med vandig ekstrakt av *H. hemerocallidea* kan skade nyrefunksjonen ved blant annet å redusere glomerulær filtrasjonsraten (Musabayane et al 2005).

Det er funnet bevis for at ekstrakter av *H. hemerocallidea* har antiinflammatorisk, antinoplastisk, antioksidant, antidiabetisk og antiinfektive egenskaper *in vivo* og *in vitro*. Det er funnet antinoceptive (i mus), antiinflammatoriske og antidiabetiske egenskaper (i rotter) *in vivo* ved bruk av vandige *H. hemerocallidea*-ekstrakter (Owira og Ojewole 2009). I nøye kontrollerte eksperimenter med rotter og mus ble det vist at disse fikk høyere terskel for smerte når de fikk spesifikke doser av vandig ekstrakt av *H. hemerocallidea* (Drewes og Elliot 2008). I rotter er det vist at metanolekstrakt av denne planten har sterke antiinflammatorisk effekt enn vandig ekstrakt (Gaidamashvili og Van Staden 2006).

Moderate til høye doser av av *H. Hemerocallidea* (100-800 mg/kg peroralt) til rotter ga doseavhengig, signifikant reduksjon i glukose-konsentrasjoner i blodet til fastende friske og hyperglykemiske rotter. (Mahomed og Ojewole 2003).

Rooperol har vist å ha anti-cancer, anti-inflammatorisk, bakteriostatisk og bakteriocidal aktivitet (Nair et al 2007). Når det gjelder antimikrobiell aktivitet, er det vist at hypoxosid hemmere i sterkere grad Gram-positive enn Gram-negative bakterier, mens rooperol har vist sterk antimikrobiell aktivitet (Laporta et al 2007). Både vann-og etanol ekstrakter av planten hemmer veksten av *E. coli* (patogen ved benign prostata hyperplasi) (Steenkamp et al 2006). Det er rapportert at ekstrakter av denne planten kan hemme syntese, produksjon og/eller frigjøring av inflammatoriske cytokiner og mediatorer som prostaglandiner (Ojewole 2006a). Nyere *in vitro* funn indikerer at lektinliknende proteiner fra vandig ekstrakt kan hemme cyclooxygenase (COX) som medierer prostaglandin syntese (Gaidamashvili og Van Staden 2006).). I *in vitro* modeller har rooperol vist signifikant hemming COX-1 og 2. Det bestrides om den antiinflammatoriske effekten av rooperol skyldes hemming av 5-lipooksygenase-veien heller enn COX. Rooperol kan være den komponenten i planteekstraktet som er ansvarlig for hemming av COX-1 og 2, noe som kan bidra til antiinflammatoriske og antinoceptive egenskaper til *H. hemerocallidea* (Laporta et al 2007). Hydroksylradikal scavengere undertrykker oppregulering av COX, og dermed hemmer inflammasjon. Pasienter med benign prostata hyperplasi overuttrykker COX-1 og har en reduksjon i produksjon av prostaglandin E-1 (Steenkamp et al 2006). Rooperol har signifikant antioksidant aktivitet, den er blant annet vist å være en relativt potent fri radikal scavenger ved høye konsentrasjoner. Dikatekol strukturen til denne substansen gir sannsynligvis antioksidant egenskaper. Selv om hypoxosid ikke har vist en slik effekt (selv ved en høy konsentrasjon på 32 µg/ml) kan den være en antioksidant prodrug (Nair et al 2007). Figur 3.11 oppsummerer de antiinflammatoriske effektene av *H. hemerocallidea*.



Figur 3.11 Anttinflammatorisk effekt av *H.hemerocallidea*-ekstrakter kan skyldes hemming av lipooksygenase, COX og cytokinproduksjon. Antioksidant aktiviteten kan komme fra reduksjon i produksjon av reaktive oksygen spesier, enten ved hemming av CYP-enzymen eller direkte hemming av COX (Owira og Ojewole 2009). Pil opp og ned betyr henholdsvis opp- og nedregulering, og rød ring med strek viser hemmende effekt av planteekstrakt.

Det er blitt foreslått at de anticarcinogene egenskapene til rooperol skyldes denne forbindelsens evne til å fremme non-lamellære fase i cellemembraner, hvor aktiviteten til enzymer som Protein kinase C reguleres, heller enn påvirkning på celleprolifisering og signalisering (Laporta et al 2007). Rooperol sitt cytotoksiske effekt består av vakuolisering av cytoplasma og dannelsen av porer i plasmamembranen, og danner mulighet for apoptose. Dette kan nyttiggjøres i tumorer med mye β -glukosidase (som nevnt omdanner inaktive hypoxosid til bioaktive rooperol). Dessuten er rooperol en potent hemmer av leukotrien syntese i leukocytter (Albrecht et al 1995). Rooperol har vist å hemme veksten av 60 humane kreftcellelinjer som ble testet inkludert bryst, colon, uterus, melanoma og lungekreft celler (Boukes og Van de Venter 2008).

In vitro studier har vist at β -sitosterol og β -sitosterol glykosidet stimulerer proliferering av human perifer lymfocyt. Disse sterolene, både hver for seg og i kombinasjon, øker *in vitro* aktiviteten til NK-celler og har evne til å øke T-celle proliferative responser *in vitro* og *in*

vivo (Bouic et al 1996). Utenom disse studiene er det verken biokjemiske eller kliniske bevis som støtter den immunstimulerende bruken av *H. hemerocallidea* (Owira og Ojewole 2009).

Det har blitt vist at *H. hemerocallidea* hemmer 86 % av normal CYP3A4-aktivitet, og hemmer noe av aktiviteten til legemiddeltransportøren P-glykoprotein (P-gp). En annen *in vitro* studie konkluderte med at ekstrakter og formuleringer som inneholder signifikant mengde hypoxosid viser høy grad av induksjon av P-gp. Det er vist at hypoxosid med en konsentrasjon på 3,6 mg/ml hemmer ca. 33 % av CYP3A4, 11 % av CYP3A5 og 41 % av CYP19 sin aktivitet. Mens rooperol har vist mye større hemmende aktivitet (> 98 %) på CYP3A4 og 3A5 ved en konsentrasjon på 50 µg/ml. Rooperol har ikke vist effekt på P-gp selv ved høy konsentrasjon. Med den vanlige daglige dosen av planten (200 ml bestående av > 37 mg/ml av *H. hemerocallidea*) kan det se ut til at hypoxosid ikke hemmer CYP3A4, 3A5 eller CYP 19, men at denne dosen gir en signifikant *in vivo* konsentrasjon av enzymhemmende forbindelsen rooperol. Selv om det ble brukt høye konsentrasjoner av rooperol og hypoxosid i noen av disse studiene gir de signaler om *H. hemerocallidea* sitt potensial til å hemme enzymer som metaboliserer blant annet antiretrovirale legemidler. Dette underbygges også av det faktum at omdannelsen til rooperol er komplett i GI-traktus (Mills et al 2005, Nair et al 2007).

I dyremodeller har ekstrakter av *H. hemerocallidea* (25-400 mg/ml) vist uterolytisk aktivitet trolig via ikke-spesifikk spasmolytisk mekanisme (Nyinawumuntu et al 2008). En dyrestudie indikerer at vannekstrakt av *H. hemerocallidea* har antiepileptiske egenskaper enten ved å bedre neurotransmisjon av GABA og/eller effekt på hjernen. Effekten kan delvis skyldes ekstraktets sedative og hypnotiske effekter (Ojewole 2008). I dyremodeller har vannekstrakt av *H. hemerocallidea* (25-400 mg/ml) vist kardiodepressiv (bradykardi) og forbigående antihypertensiv effekt (Ojewole 2006b).

Det er identifisert to hovedkomponenter i planten som er bioaktive; rooperol og noen av sterolene. Trolig er det flere innholdsstoffer i denne planten som bidrar til de overnevnte farmakologiske effektene (Owira og Ojewole 2009). Per i dag er det ikke funnet/gjort noen studier på polysakkarider i *H. hemerocallidea*. På bakgrunn av tidligere forskning på polysakkarider, og tradisjonell bruk av denne planten har man sett potensialet for forskning på polysakkarider i *H. hemerocallidea* og immunmodulerende aktivitet knyttet til denne polymeren.

4. Oppgavens målsetting

I denne oppgaven utføres det studier på polysakkarider fra *Hypoxis Hemerocallidea*.

Hensikten med oppgaven er å isolere og strukturoppklare polysakkarider fra denne planten.

Videre skal det utføres biologiske tester på polysakkaridene *in vitro* for å finne immunmodulerende aktivitet, og struktur- og aktivitetsforhold gjennomgås.

5. Metoder

5.1 Generelle metoder

5.1.1 Vannkvalitet

Det ble brukt destillert vann i alle metodene. Vannet ble destillert med Elix® millipore med Progard® 2 w/o polyfenol filter.

5.1.2 Innveiling

Analysevekt: Mettler Toledo PB 3002
Mettler BB 2400
BP 121 S (Sortarius) (FHI)

Overskålsvekt: OHAUS Portable Advanced CT1 200V

5.1.3 Filtrering

Gasbind

Membranfilter: Acrodisc® 4 mm Syringe filter 0,45 µm Versapor® Membran (Pall®)
Acrodisc® 37 mm Syringe filter med 1 µm glassfiber membran (Pall®)

Andre filtre: Filterpapir 46 x 57 cm (Whatmann ®)

5.1.4 Sentrifugering

Multifuge 4 KR Centrifuge (Heraeus) (metode 5.2.2 og 5.2.3)

Martin Christ Osterode (Harz) (FHI)

Multifuge 3 SR+ Centrifuge (Heraeus) (FHI)

5.1.5 Blanding av løsninger

Det ble brukt følgende utstyr for blanding av løsninger:

Whirlimixer (Fisons)

Whirlimixer Reax 2000 (Heidolph) (FHI)

5.1.6 pH-målinger

For å måle pH ble det benyttet ett av følgende:

- pH-papir, universalindiaktor pH: 0-14 (Merck)
- pH meter S20 (Mettler Toledo)

Kalibrering av pH-meteret ble utført med Hamilton Duracal buffer; pH 4.01, 7.00 og 10.01.

5.1.7 Avgassing/evakuering av luft

Uønsket oksygen og/eller luft ble fjernet ved bruk av en følgende trinn:

- a) Gjennombobling med helium i 10-15 minutter
- b) Vakuum fra vannstråle/pumpe i 15-30 minutter

Vakuumpumpe som ble brukt var ILMVAC, Typ 400171 Membanpumpe (Chemiefest).

5.1.8 Volumreduksjon

For å redusere volumet av væsker (ved å fjerne løsemiddelet), og dermed øke konsentrasjonen til løsninger ble det tatt i bruk flere metoder. Det ble brukt rotavapor (metode 5.1.9), frysetørker (metode 5.1.10) og avblåsing med nitrogen (sammen med varmemanteltype Reacti-therm III (Pierce)). For enkelte løsninger ble det benyttet en kombinasjon av flere metoder.

5.1.9 Oppkonsentrering med rotavapor

Prinsipp

Med rotavapor er det mulig å dampe inn løsninger skånsomt med vakuum og varme slik at løsninger oppkonsentreres. Med det roterende stempelet oppnås effektivt varmeoverføring for rask avdamping og en jevn blanding av innholdet, samtidig som det forhindrer lokal overoppheting. Denne metoden ble også tatt i bruk for å fjerne lettflyktige forbindelser og organiske løsemidler (Büchi Labortechnik AG 2010).

Utstyr

Büchi Rotavapor R-200 (Laboratoriums-technik AG), med oppsats for vannstrålevakuum og avkjøling

RV 10 (IKA®), med oppsats for vannstrålevakuum og avkjøling

Rundkolbe/pærekolbe

Prosedyre

Løsninger ble inndampet på rotavapor ved ca. 40° C under vakuum.

5.1.10 Frysetørking**Prinsipp**

Det frosne vannet i prøven sublimerer ved å redusere trykket ved hjelp av vakuum. Sluttproduktet blir porøst fordi iskrystallene som sublimerer etterlater porer. Dermed øker prøvematerialets løselighet i vann, noe som er gunstig for senere analyser (Freeze dryer systems europe 2010).

Utstyr

Metanolbad: HETOFRIG (Heto Birkerød)

Frysetørker: Alpha 1-4 (Christ®)

Alpha 1-6 (Christ®)

Prosedyre

1. Hvis mengde prøveløsning var stor, ble løsningen dampet inn på rotavapor til egnet volum.
2. Avhengig av volumet til prøveløsningene, ble de enten frosset ned under rotasjon i metanolbad ved -40 °C eller i fryser.
3. Prøver i rundkolber ble festet utenpå frysetørkeren, mens prøver i andre beholdere ble dekket med perforert parafilm og satt inn i frysetørkeren.

5.1.11 Absorbansmålinger

For absorbansmåling ble det benyttet følgende apparater:

Modell 3550 Microplate Reader (BIO-RAS) (metode 5.3.1)

Thermomax (FHI)

5.1.12 Syrevask av glassutstyr

Prinsipp

For å unngå kontaminasjon av karbohydrater ble glassutstyr(brukt metylering og metanolyse)syrevasket. Forurensninger som glukose, mannose og celluloserester kan interferere med analyser. Saltsyren hydrolyserer sukkeret, og degraderingsproduktene blir fjernet fra glasset med rennende vann.

Utstyr

Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)

Beskyttelsesutstyr

Reagenser

Konsentrert HCl 37 % (Merck)

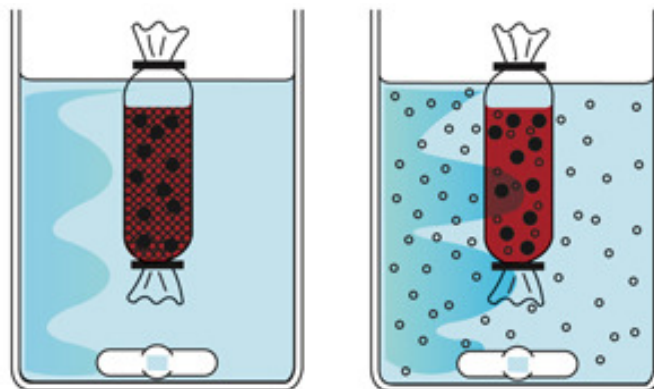
Springvann og destillert vann

Prosedyre

1. Glassutstyret ble skylt og dekket med HCl, og satt til henstand i 30 minutter.
2. Utstyret ble skylt grundig, først i springvann deretter i destillert vann.
3. Glassutstyret ble tørket i varmeskap ved 80 °C.

5.1.13 Dialyse

Prinsipp



Figur 5.1 Dialyseprosessen starter med høy konsentrasjonsgradient (til venstre), og avsluttes når det blir likevekt (høyre) (Spectrum® Laboratories Inc 2010).

Dialyse er en enkel prosess hvor lavmolekylære stoffer diffunderer fra høy til lav konsentrasjon gjennom semipermeabel membran til likevekt oppnås (se figur 5.1). På denne måten kan en løsning med høymolekylære forbindelser (for eksempel polysakkarider) renses ved at uønskede lavmolekylære stoffer, som salter, fjernes. Ved å bruke dialyseslanger med MWCO (Molekyl weight cut-off) for eksempel 3500 Da holdes molekyler med molekylvekt 3,5 kDa eller mer tilbake i slangene, mens mindre molekyler diffunderer ut i dialysevannet (Spectrum® Laboratories Inc 2010).

Utstyr

Dialyseslanger: Spectra/por® MWCO: 3500, d: 29 mm (Spectrum Laboratories Inc)

Kokeplate

Stort begerglass

Plastbøtte

Magnet og magnetrører

Dialyseklemmer

Glasstaver

Reagenser

2 % NaOH (aq) (Prolabo)

Springvann og destillert vann

0,05 % NaN₃ (aq) (Merck)

Toluen (Prolabo)

Mettet AgNO_3 (Merck)

Prosedyre

A: Vask av dialyseslanger

1. Dialyseslangene ble klippet til ønsket lengde, og vasket utvendig og innvendig med springvann.
2. Deretter ble de lagt i kokende 2 % NaOH -løsning i 10 minutter.
3. Etter koking ble de vasket grundig både innvendig og utvendig, først med springvann så med destillert vann.
4. Slangene ble kokt på nytt i destillert vann i 10 minutter.
5. Dialyseslangene ble oppbevart i kjøleskap i 0,05 % NaN_3 (aq).
6. Når dialyseslangene skulle tas i bruk, ble konserveringsmiddelet fjernet ved at slangene ble lagt i destillert vann i 30 minutter og til slutt ble de vasket godt med destillert vann.

B: Dialyse av høymolekylære forbindelser

1. Dialyseslangene ble lukket i den enden ved hjelp av klemmer, og fylt litt med destillert vann for å forsikre at de var tette.
2. Slangene ble fylt $\frac{3}{4}$ fulle med løsning. Hvis løsningen hadde høy saltkonsentrasjon, ble slangene fylt halvfulle. Da slangene kan sprekke grunnet diffusjon av vann inn i slangene.
3. Det ble tilsatt 3-4 dråper av konserveringsmiddelet, toluen, i slangene.
4. Luft ble fjernet fra slangene før de ble lukket med klemmer.
5. Slangene ble overført til en plastbøtte med destillert vann.
6. Dialyseslangene ble holdt vekk fra bunnen ved hjelp av glasstaver, og bøtten ble satt på benken under omrøring. Hvis dialysen foregikk over flere dager ble bøtten satt i kjøleskap, ved 4 °C, under omrøring.
7. Dialysevannet ble skiftet ofte. Når 2 ml av dialysevannet ikke lenger ble blakket av noen dråper med AgNO_3 -løsning, var dialysen avsluttet.

5.1.14 Ultrafiltrering

Prinsipp

Prøveløsningen pumpes inn i filteret. Filteret siler ut de lavmolekylære stoffene (<5 kDa) som kommer ut via den ene slangen, mens de høymolekylære substansene resirkuleres tilbake til prøveløsningen. Denne metoden fjerner lavmolekylære substanser fra prøveløsningen, samtidig som løsningen oppkonsentreres.

Utstyr

Pumpe: Watson Marlow 520 S

Filter: UltrasetteTM Omega 5K PALL Corporation suspended screen channel

Slangeklemmer

Erlenmeyerkolber

Reagenser

Destillert vann

0,1 M NaOH(aq) (Prolabo)

0,3 M NaOH(aq) (Prolabo)

Prosedyre

1. Filteret ble vasket med destillert vann over natt.
2. Midtre utgang stenges med en slangeklemme.
3. Prøveløsningen pumpes gjennom filteret i 5 minutter.
4. Den midterste utgangen åpnes forsiktig slik at den lavmolekylære delen av løsningen renner ut i vasken.
5. Den andre utgangen av pumpen, hvor de høymolekylære forbindelsene kommer ut, stenges med en slangeklemme for å lage et høyt trykk. Fra denne utgangen skal det renne mindre løsning enn den midtre utgangen, og de høymolekylære substansene resirkuleres tilbake til prøveløsning.
6. Filtreringen avsluttes når prøveløsningen har fått et passende volum.

Vask og oppbevaring av Ultrasette

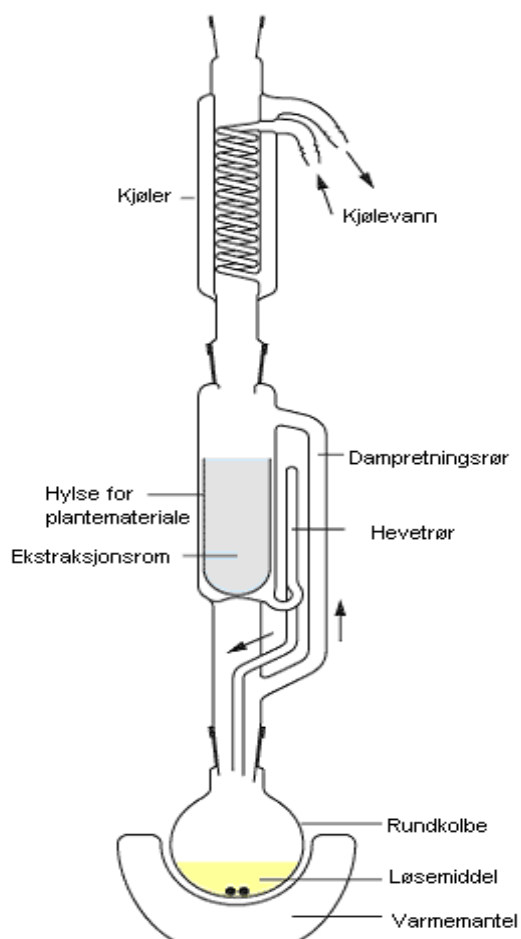
1. Begge utgangene vaskes med destillert vann over natt eller til det ikke lenger drypper mørk løsning fra utgangene.
2. Ultrasetten vaskes med 1 liter 0,3 M NaOH (aq), eller til det som kommer ut av utgangene ikke lenger er farget. NaOH-løsningen skal renne ut i vasken.
3. Neste vasketrinn er med 2 liter 0,3 M NaOH (aq) som resirkuleres. Vaskes i 15 minutter.
4. NaOH-løsningen vaskes ut fra Ultrasetten med destillert vann til det som kommer ut av utgangen er nøytralt. pH kontrolleres med pH-papir.
5. Til slutt pumpes 0,1 M NaOH (aq) inn i Ultrasettene, alle inn- og utganger lukkes og Ultrasetten oppbevares ved 4 °C.

5.2 Isolering av polysakkarider

5.2.1 Ekstraksjon med diklormetan og metanol

Prinsipp

Ved å bruke organiske løsemidler ekstraheres det ut lipofile stoffer (for eksempel C 20-fettsyrer) og lavmolekylære forbindelser. Disse uønskede substansene som ikke er løselige i diklormetan, fjernes ved ekstraksjon med metanol. Dessuten blir proteiner degradert ved ekstraksjon med organiske løsemidler, dette er ønskelig for proteiner kan interferere med videre analyser. Ekstraksjon med organiske løsemidler utføres ved bruk av soxhlet (figur 5.2).



Figur 5.2 Soxhletapparat (Departement Chemie der Universitat Basel 2010).

Utstyr

Filterpapir 46 x 57 cm (Whatmann ®)

Varmemantel

Stor rundkolbe (5 liter)

Soxhlethylse

Soxhletkolonne tilkoblet kjøler

Reagenser

Diklormetan (Sigma-Aldrich)

Metanol purum destillert (Chemi-teknik AS)

Prosedyre:

1. Hylsen ble fylt med knust plantemateriale (ca 438 g), og dekket med filtrerpapir.

2. Soxhleten ble fylt helt med diklormetan og ble tømt, deretter etterfylt med løsemiddel for å hindre uttørring, totalt ca 4 liter.
3. Plantematerialet ble ekstrahert til løsemiddelet ble blank.
4. Løsemiddelet ble fjernet fra systemet, før prøvematerialet ble ekstrahert videre med metanol med samme metode.
5. Plantematerialet ble tørket på aluminiumsfolie i romtemperatur.
6. Diklormetan- og metanolekstraktene ble ikke brukt videre.

5.2.2 Ekstraksjon med 50 % etanol

Prinsipp

Ekstraksjon med 50 % etanol renser plantematerialet ytterligere ved at lavmolekylære forbindelser som er delvis vannløselige fjernes. Disse forbindelsene kan være salter, pigmenter, organiske syrer, lavmolekylære sukker og proteiner. Residumet vil hovedsakelig bestå av proteiner og høymolekylære karbohydrater som cellulose, pektiner og stivelse (Brummer og Cui 2005).

Utstyr

Stor kjele med lokk

Kokeplate (Wilfa CP-1)

Termometer

Røreredskap

Nutsj-trakt, gasbind og kolbe med vakuumsug

Reagenser

Etanol (Sigma-Aldrich)

Destillert vann

Toluen (Prolabo)

Prosedyre

1. Tørket plantematerialet fra metode 5.2.1 ble overført til en stor kjele (med lokk for å hindre fordamping).

2. Det ble tilsatt 4 liter 50 % etanol.
3. Plantematerialet ble ekstrahert ved ca. 60 °C i 2 timer. Det ble rørt og temperaturen kontrollert med jevne mellomrom.
4. Prøveløsningen ble sentifugert, og supernatanten ble sugd av og samlet opp.
5. Prøvematerialet ble ekstrahert på nytt med 2 liter 50 % etanol ved ca. 60 °C.
6. Punkt 4 ble gjentatt.
7. Ekstraktene ble slått sammen og sentrifugert ved 4000 rpm i 15 minutter for å fjerne planterester.
8. Etanolekstraktet ble filtrert gjennom nutsal-trakt med gasbind og vakuum for å fjerne mindre partikler som ikke ble fjernet ved sentrifugering.
9. Etanolen i ekstraktet ble dampet av på rotavapor (metode 5.1.9).
10. Det ble tilsatt noen dråper toluen (ca. 2 dråper per liter) til ekstraktet.
11. Det ble brukt ultrafiltrering (metode 5.1.14) på etanolekstraktet for å redusere volumet og fjerne lavmolekylære forbindelser.
12. Ekstraktet ble dialysert (metode 5.1.13), og lagret ved 4 °C.

5.2.3 Ekstraksjon med vann

Prinsipp

Siden polysakkarider er vannløselige brukes vann for å kunne ekstrahere ut polysakkarider fra plantematerialet. Løseligheten til polysakkarider, og dermed ekstraherbarheten av dem, øker med temperaturen slik at 50 °C- og 100 °C- vannekstraktene vil ha ulik sammensetning av polysakkarider.

Utstyr

Stor kjele med lokk

Kokeplate (Wilfa CP-1)

Termometer

Røreredskap

Reagenser

Destillert vann

Toluen (Prolabo)

Prosedyre

1. Plantematerialet fra metode 5.2.2 ble overført til en stor kjele med lokk.
2. Det ble tilsatt 4 liter destillert vann.
3. Plantematerialet ble ekstrahert ved ca. 50 °C i 2 timer. Det ble rørt og temperaturen kontrollert med jevne mellomrom.
4. Prøveløsningen ble sentrifugert ved 4000 rpm i 15 minutter, og supernatanten ble sugd av og samlet opp.
5. Plantematerialet ble ekstrahert med 2 liter destillert vann ved 50 °C i 2 timer.
6. Punkt 4 ble gjentatt.
7. Ekstraktene ble slått sammen, og tilsatt noen dråper toluen for å hindre bakterievekst.
8. For å redusere volumet og fjerne lavmolekylære forbindelser, ble det brukt ultrafiltrering (metode 5.1.14).
9. Ekstraktet ble dialysert (metode 5.1.13) og lagret ved 4 °C.
10. Plantematerialet ble overført til en stor kjele med lokk.
11. Det ble tilsatt 4 liter destillert vann.
12. Plantematerialet ble ekstrahert ved ca. 100 °C i 2 timer. Det ble rørt og temperaturen kontrollert med jevne mellomrom.
13. Ekstraktet ble sentrifugert ved 4000 rpm i 15 minutter, og ekstraktet ble tatt ut.
14. Plantematerialet ble ekstrahert med 2 liter destillert vann ved ca. 100 °C i 2 timer. Det ble rørt og temperaturen kontrollert med jevne mellomrom.
15. Punkt 13 ble gjentatt.
16. Ekstraktene ble slått sammen, og tilsatt noen dråper toluen for å hindre bakterievekst.

17. For å redusere volumet og fjerne lavmolekylære forbindelser, ble det brukt ultrafiltrering (metode 5.1.14).

18. Ekstraktet ble dialysert (metode 5.1.13) og lagret ved 4 °C.

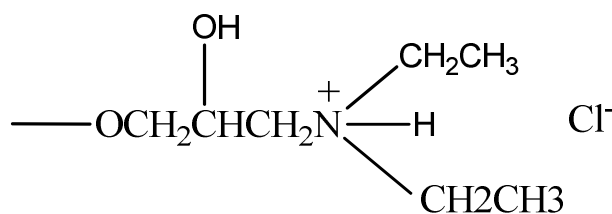
5.2.4 Ionebytterkromatografi

Prinsipp

Separasjon på ionebytterkromatografi er basert på elektrostatisk tiltrekning mellom ladede grupper på prøven og de motsatte ladde ionene på stasjonærfasen. Stasjonærfasen har kovalent bundne positivt eller negativt ladde ioner, og derav deles i henholdsvis anion- eller kationbyttere. Disse ioniske gruppene er ionebundet med et motion av motsatt ladning. Navnet ionebytterkromatografi kommer av at dette motionet byttes ut med andre ioner (Greibokk 2005). I denne oppgaven brukes en anionbytter hvor negativt ladde stoffer blir retardert på kolonnen, i motsetning til nøytrale og positivt ladde forbindelser som elueres ut med mobilfasen. De negativt ladde forbindelsene elueres ut med NaCl-gradient.

ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)

ANX Sepharose 4 Fast Flow er en svak anionbytter som består av kryssbundet agarose. Dette materialet har høy fysisk og kjemisk stabilitet. Den ioniske kovalent bundne gruppen er dietylaminopropyl-gruppe, figur 5.3, med kloridioner som motion (Amersham Biosciences 2000).



Figur 5.3 Dietylaminopropyl-gruppe med kloridion (Amersham Biosciences 2000).

Utstyr

Kolonnemateriale:	ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)
Kolonne:	Pharmacia Biotech
Etter pakking av kolonnen:	h: 30 cm, kolonnevolum ca. 590 ml

Pumpe:	Pump P-1 (Pharmacia Biotech)
Fraksjonssamler:	LKB-Superfrac TM (Pharmacia)
Oppsamlingsrør:	12 ml plastrør (Heger AS)

Reagenser

Destillert vann

2 M NaCl (aq) (Chemie-Teknik AS)

1 M NaOH (aq) (Prolabo)

1 M Natriumacetat (aq) (Prolabo), justert til pH 3 med H₂SO₄ (95-97%) (Merck)

AgNO₃-mettet løsning (aq) (Merck)

20 % etanol (v/v) (aq) (Sigma-aldrich)

Løsningene ble romtemperert og avgasset (metode 5.1.7 a) før bruk.

Prosedyre**A: Pakking av kolonne**

Kolonnematerialet som ble benyttet var pakket klar til bruk.

B: Applisering og eluering av prøveløsning

1. Før prøvepåsetting ble kolonnen vasket med 2 kolonnevolum destillert vann.
2. Ca. 600 ml av prøveløsning ble applisert på kolonnen.

Flowhastighet: 2 ml/min

3. Først ble de nøytrale forbindelsene eluert med 1,5 kolonnevolum destillert vann.

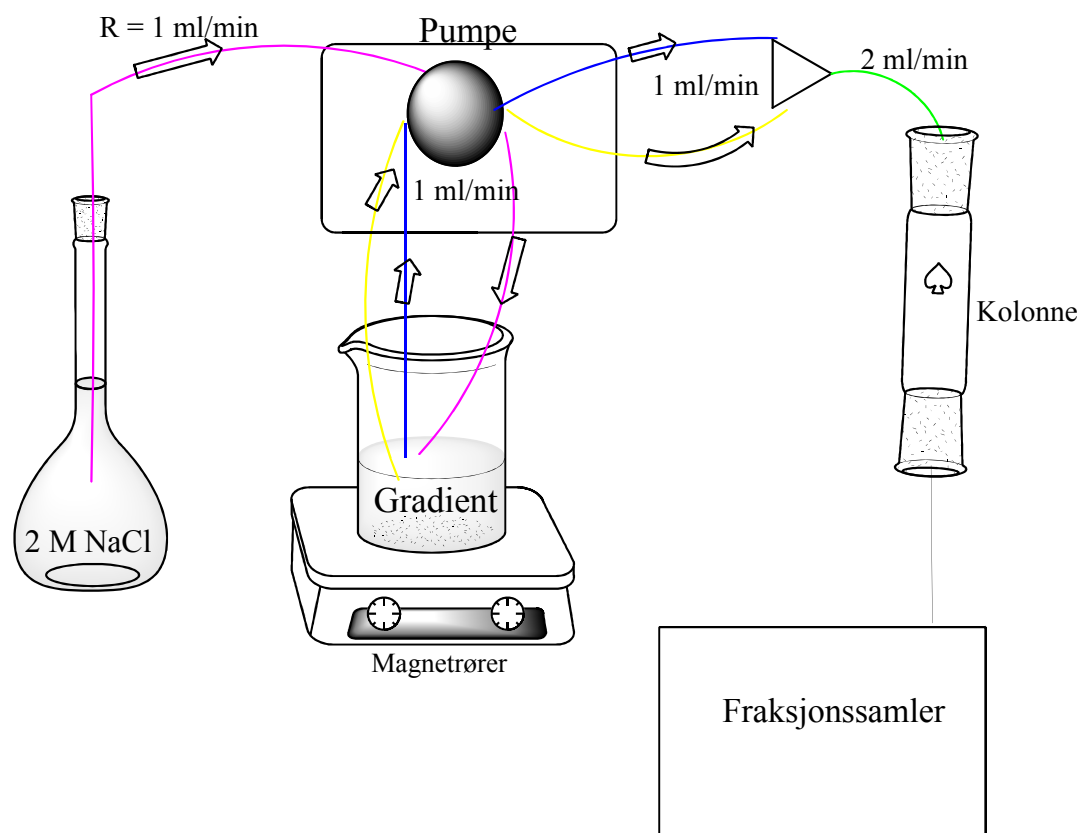
Flowhastighet: 2 ml/min

4. Sure polysakkarider ble deretter eluert med en linær NaCl-gradient (0-1,5 M).
Se figur 5.4 for oppsett av gradient-elueringen.

Flowhastighet fra saltløsning til blandekar: 1 ml/min

Flowhastighet fra blandekar til kolonne: 2 ml/min

Fraksjonene ble samlet opp i 180 rør med 6 ml i hvert glass.



Figur 5.4 Oppsett over eluering av polysakkarider med NaCl-gradient.

Det ble brukt følgende formel for utregning av saltgradienten:

$$C/T = (C_0 \cdot R)/V_0.$$

C = konsentrasjonen i blandekaret ved tiden T , T = tid forsøket skal ta,
 C_0 = Startkonsentrasjon av NaCl i saltløsningen, R = hastigheten fra
 saltløsningen til blandekaret, V_0 = startvolumet i blandekaret ved tiden
 $T = 0$

I dette tilfellet er $C = 1,5$ M, $T = 1080$ minutter, $C_0 = 2$ M, $R = 1$ ml/min
 og V_0 er ukjent.

5. Det ble til slutt eluert med 2 M NaCl i 180 rør.
6. FS-testen ble benyttet på fraksjonene. På bakgrunn av resultater fra denne testen ble fraksjonene samlet opp, avdampet ved behov, dialysert og frysetørket.
7. Kolonnen ble vasket og regenerert med trinnene beskrevet under.
8. Punkt 1-8 ble gjentatt til all prøvematerialet var separert på kolonnen.

B: Vask og regenerering av kolonnen

1. Hvis kolonnematerialet øverst var sterkt farget øverst ble dette laget fjernet med pasteurpipette.
2. Kolonnen ble snudd 180 °C.
3. Kolonnen ble vasket med 1,5 kolonnevolum med 1 M NaOH.
4. Kolonnen ble regenerert med kloridioner ved bruk av 2 kolonnevolum 2 M NaCl.
5. For å fjerne overflødige kloridioner ble det vasket med destillert vann helt til 2 ml eluat ikke ble blakket av 1 dråpe AgNO₃-løsning (ca. 5 kolonnevolum).

Hvis kolonnen var veldig skitten ble den i tillegg vasket med natriumacetat. Prosedyren er da som følger:

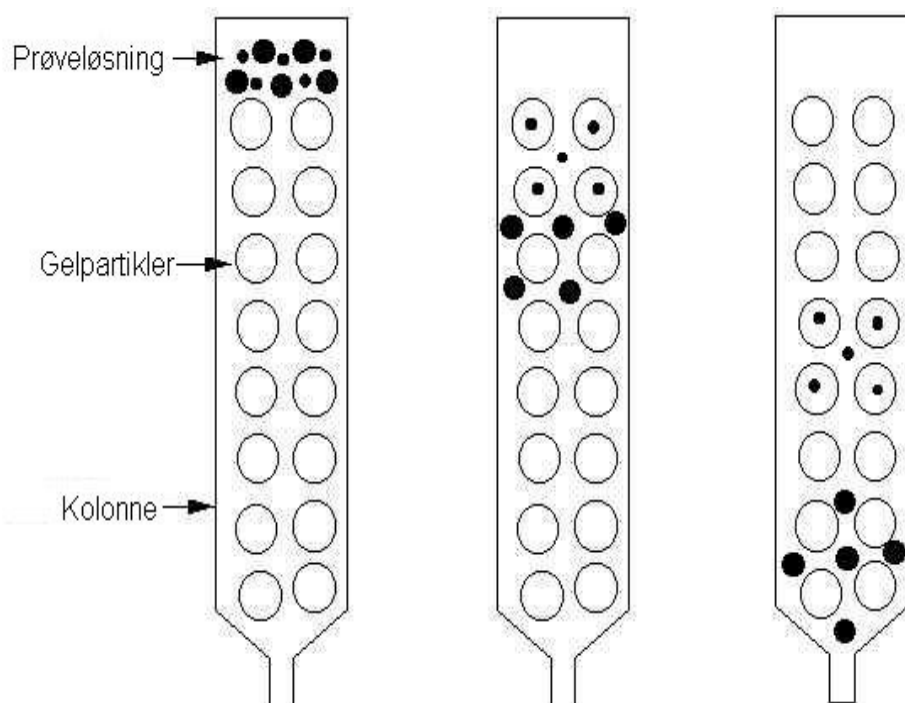
1. Hvis kolonnematerialet var sterkt farget øverst ble dette laget fjernet med pasteurpipette.
2. Kolonnen ble snudd 180 °C.
3. Kolonnen ble vasket med 1 kolonnevolum 1 M natriumacetat pH 3.
4. Kolonnen ble så vasket med 1,5 kolonnevolum 1 M NaOH.
5. Deretter ble den vasket med 1,5 kolonnevolum natriumacetat pH 3.
6. For å regenerere kolonnen ble det eluert med 2 kolonnevolum 2 M NaCl.
7. Til slutt ble det vasket med destillert vann helt til 2 ml eluat ikke ble blakket av 1 dråpe AgNO₃-løsning (ca. 5 kolonnevolum).

Kolonnen ble konserveret ved at den ble vasket med et kolonnevolum med 20 % etanol, og ble så satt til lagring ved 4 °C.

5.2.5 Gelfiltrering

Gelfiltrering brukes for å separere stoffer basert på deres molekylstørrelse og struktur. Stasjonærfasen er porøs materiale med kuleformede partikler. I denne oppgaven brukes gelfiltrering for å rense og separere polysakkaridene. Retensjonen til molekylene øker ved avtakende molekylstørrelse. Små molekyler diffunderer inn i porene og elueres ut senere. Som figur 5.5 viser vil forbindelser større enn porene passere ut med mobilfase ved void

volumet (eluert volum av molekylene som ikke retarderes i kolonnen) (GE Healthcare Bio-Sciences AB 2007a).



Figur 5.5 Prinsippet bak gelfiltrering. Store molekyler går rett kolonnen uten retensjon, mens mindre partikler blir retardert av det porøse pakkematerialet.

Sephacryl S-200

Sephacryl består av en gelmatriks med kryssbundne allyl dekstran med N,N'-metylenbisacrylamid. Det kan benyttes høy elueringshastighet grunnet høy kjemisk stabilitet og stor mekanisk styrke. Dette kolonnemateriale separerer stoffer med molekylvekt mellom 1000-80 000 D (fraksjoneringsområde). Molekyler som er større enn cut-off verdien, 80 000 Da, vil elueres ut med voidvolumet (GE Healthcare Bio-Sciences AB 2007a).

Utstyr

Kolonne:	XK25 (Pharmacia Biotech) h: 100 cm, d: 2,7 cm
Kolonnemateriale:	Sephacryl S-200 High resolution (Pharmacia)
Etter pakking av kolonnen:	h: 83 cm, kolonnevolum ca. 475 ml
Pumpe:	Pump P-1 (Pharmacia Biotech)
Fraksjonssamler:	LKB-Superfrac TM (Pharmacia)

Oppsamlingsrør:	12 ml plastrør (Heger AS)
Mikrofilter:	Acrodisc® 37 mm Syringe filter med 1 µm glassfiber membran (Pall®)
Sprøyte:	10 ml sprøyte (BD plastipak)

Reagenser

Destillert vann

0,05 % NaN₃ (aq) (Merck)

Alle løsningene som ble brukt ble avgasset før bruk, og filtrert. Prøveløsningen ble filtrert med ovennevnte mikrofilter. Når det gjelder de andre løsningene, ble det brukt destillert vann som på forhånd var filtrert.

Prosedyre

A: Pakking av kolonne

1. Kolonnematerialet som ble benyttet var ferdig svelt i 20 % etanol-løsning.
2. Deler av supernatant ble fjernet.
3. Gelen ble avgasset (metode 5.1.7)
4. Gelmaterialet ble redispergert forsiktig for å unngå luftbobler.
5. Kolonnematerialet ble overført til kolonnen ved bruk av glasstav. Det ble tilsatt 10 ml destillert vann. For at pakkingen skulle bli tilfredsstillende ble det brukt adapter.
6. For å pakke kolonnen ble det pumpet vann gjennom kolonnen med en hastighet på 0,5 ml/min.

B: Applisering og eluering av prøveløsning

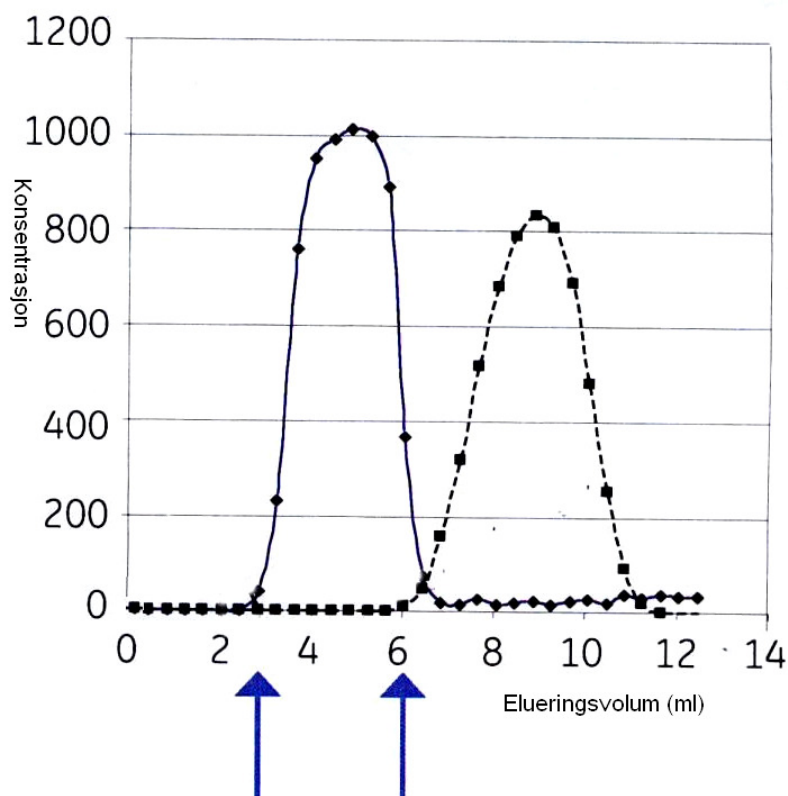
1. Mellom 126- 157 mg lyofilisert prøvemateriale ble løst i 15 ml destillert vann, og filtrert 1 µm.
2. Dette ble applisert på kolonnen med hastighet 0,5 ml/min.
3. Det ble eluert med destillert vann med hastighet 0, 5 ml/min.
4. Det ble samlet opp 120 rør à 5 ml.
5. Fenol-svovelsyretesten (metode 5.3.1) ble brukt for å bestemme karbohydratprofil.

C: Vask og regenerering av kolonnen

Siden det ble brukt destillert vann som elueringsmiddel, er det ikke nødvendig med omfattende vaskeprosedyre. Kolonnen ble ikke vasket mellom prøvepåsettingene, men etter endt eluering av alle prøveløsningene ble det vasket med et kolonnevolum med destillert, avgasset vann. Kolonnen ble konserverert ved å vaske med 1 kolonnevolum 0,05 % NaN_3 (aq), og ble lagret ved 4 °C.

PD-10 Kolonne

PD-10 kolonne er ferdigpakket Sephadex™ G-25 kolonne. Den har flere bruksområder deriblant rensing av polysakkarider. I denne oppgaven brukes kolonnen etter enzymdegradering for å fjerne lavmolekylære forbindelser fra prøveløsningen. Substanser med molekylvekt over 5000 Da, høymolekylære forbindelser, elueres ut først (se figur 5.6). Deretter elueres det ut lavmolekylære stoffer. Kolonnen separerer gruppevis, det vil si separasjonen er mellom høy- og lavmolekylære stoffer og ikke høymolekylære stoffer imellom (GE Healthcare Bio Sciences AB 2007b).



Figur 5.6 Separasjon på PD-10 kolonne, konsentrasjonen er bare for illustrasjon. Prøven påsettes, ved pilen til venstre elueres ut de høymolekylære forbindelsene mens ved den andre pilen elueres de lavmolekylære (GE Healthcare Bio- Sciences AB 2007b).

Utstyr

Kolonne:	PD-10 kolonne (GE healthcare)
Kolonnemateriale:	Sephacryl S-200 High resolution (Pharmacia)
	h: 5,0 b:1,5 cm
Kolonnevolum etter pakking:	Ca. 8,3 ml

Reagenser

Destillert vann

0,05 NaN₃ (aq)

Prosedyre

1. Kolonnen ble vasket med 25 ml destillert vann.
2. Prøveløsningen ble applisert, maksimal appliseringsvolum: 2,5 ml. Hvis løsningen var mindre enn 2,5 ml ble det tilsatt vann til maksgrensen. Eluatet ble kastet.
3. Det ble eluert med 3,5 ml destillert vann. Dette eluatet ble frysetørket (metode 5.1.10).
4. Kolonnen ble vasket med 30 ml vann.
5. Til slutt ble kolonnen konserverert med 0,05 NaN₃ (aq), og lagret ved 4 °C.

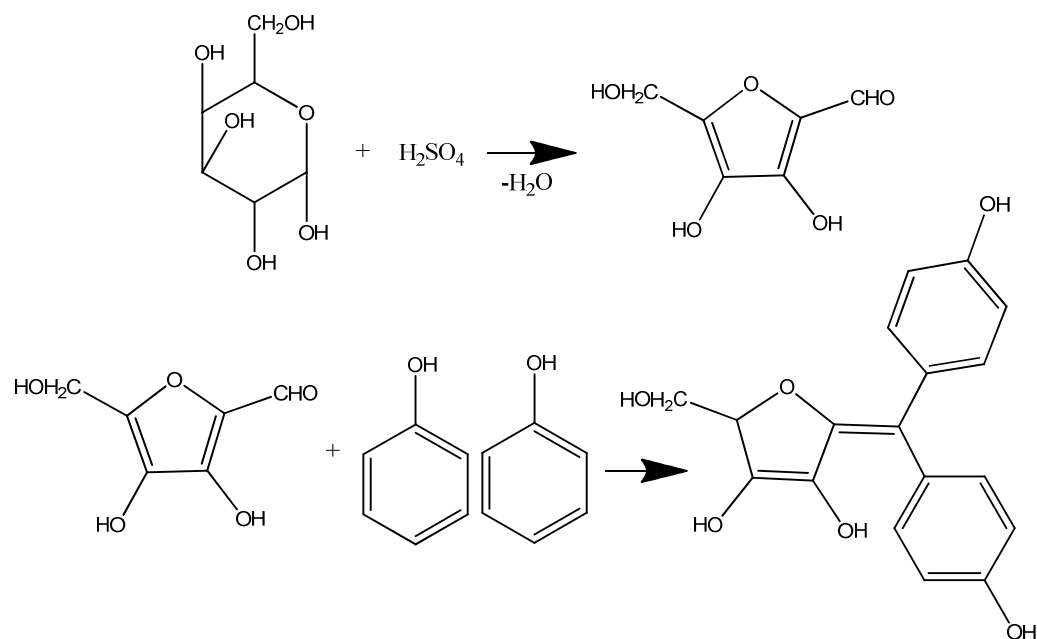
5.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

5.3.1 Fenol-svovelsyretesten

Prinsipp

I nærvær av konsentrert saltsyre og varme gjennomgår karbohydrater en rekke reaksjoner og omdannes til furanderivater. Disse kan reagere med seg selv eller fenoliske forbindelser, og danner UV-absorberende gulfarget kompleks som kan måles spektrofotometrisk (se figur 5.7). Denne metoden er sensitiv, gir stabil farge og reproducerbare resultater. Ved konstant

fenolkonsentrasjon er fargeintensiteten som dannes proporsjonal med mengde sukker i prøven (Dubois et al 1956, Brummer og Cui 2005).



Figur 5.7 Monosakkarider reagerer med svovelsyre og blir omdannet til furanderivater som i nærvær av fenol danner et farget kompleks (Sveaas 2007).

Utstyr

Finnpipette®, 40-200 μl

Gilson Micromann® pipette 100 μl

Gilson Micromann® spisser og pistons

Glassrør

Mikrotiterplater med flatbunn

Whirlimixer (Fisons)

Mikroplateleser: Model 3550 (BIO-RAD)

Verneutstyr

Reagenser

4 % fenol (aq)

Konsentrert svovelsyre (Merck)

Prosedyre

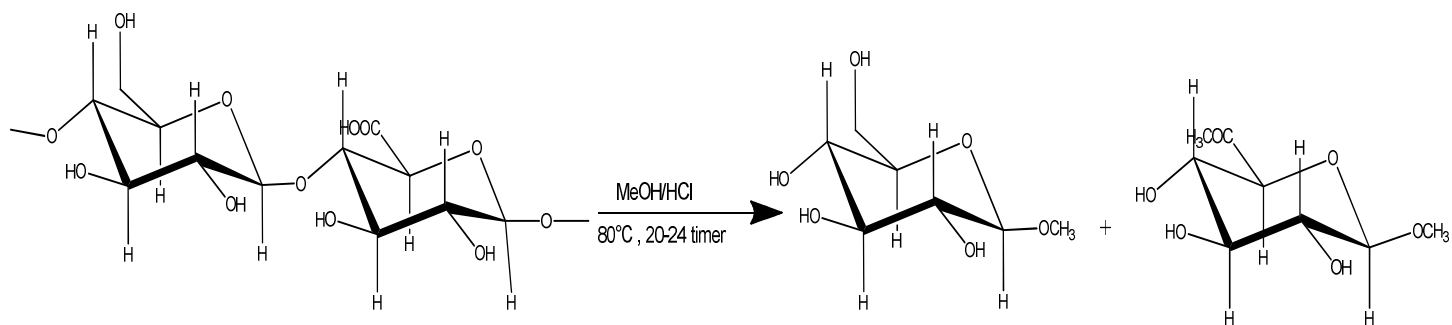
1. 100 μ l av prøveløsningen ble overført til glassrør.
2. Det ble tilsatt 200 μ l 4 % fenol (aq) og 1 ml konsentrert svovelsyre.
3. Denne blandingen ble blandet godt på whirlimixer, og satt til henstand i 30 minutter ved romtemperatur.
4. Løsningen ble blandet igjen på whirlimixer før 100 μ l av denne ble overført til mikrotiterplate.
5. Absorbansen ble avlest ved 490 nm.

5.3.2 Monosakkaridbestemmelse

Metanolyse

Prinsipp

For å kunne analysere monosakkarider bryter man først glykosidbindingene mellom monomerene i polysakkaridene. Dette gjøres ved bruk av metanolisk saltsyre som omdanner monosakkaridene til metylglykosider (se figur 5.8). Det er viktig at prøven ikke kontamineres av vann, for dette kan resultere i tap av monosakkarider. For å kunne kvantifisere monosakkarider og korrigere for eventuelle tap under metanloysen brukes mannitol som intern standard (Champers og Clamp 1971).



Figur 5.8 Glykosidbindinger brytes, og det dannes metylglykosider.

Utstyr

Supelcorør (syrevasket) med teflonbelagt kork

Transferpettor® 100 μ l (Brand)

Kapillærrør (blå)

Glasspipette (1 ml) med pelesballong

P₂O₅-evakuert vakuumsikator

Nitrogengassoppsett for avdamping

Varmeenhet Reacti-therm III (Pierce)

Reagenser

4 M HCl i metanol

Intern standard: 1,0 µg/µl i 1 M HCl

Vannfri metanol (Chemi-teknik AS)

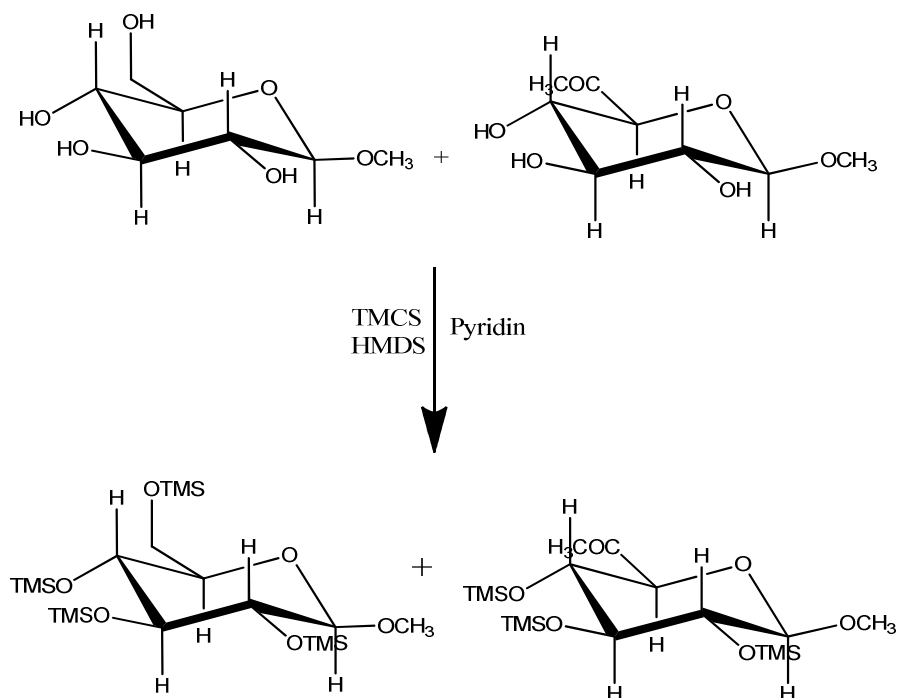
Prosedyre

1. 1 mg av frysetørket plantemateriale ble innveid i syrevaskete supelcorør.
2. Dette røret ble dekket med perforert parafilm og satt i vakuumsikator over natt.
3. Det ble tilsatt 1 ml metanolisk 4 M HCl og 100 µl mannitol.
4. Kork ble skrudd på, og røret ble satt i varmeskap ved 80 °C i 20-24 timer. Etter 10-15 minutter ble korken løsnet for å slippe ut trykket, så skrudd godt igjen for å hindre fordamping.
5. Prøven ble inndampet til tørrhet med N₂-gass.
6. Det ble tilsatt 200 µl vannfri metanol, og dampet av. Dette ble gjentatt tre ganger.
7. Prøven ble tørket i P₂O₅-eksikator i minst en time før den ble TMS-derivatisert.

TMS-derivatisering

Prinsipp

For å kunne separere de spaltede monosakkaridene, fra metanolysen, på GC må disse være flyktige. Dette oppnås ved at de frie hydroksylgruppene blir omgjort til TMS (trimetylsilyl)-derivater ved tilsetning av heksametyldisilazan og trimetylklorasilan med pyridin som løsemiddel, se figur 5.9. Derivatiseringen skjer raskt og nesten komplett ved romtemperatur (Sweeley et al 1963).



Figur 5.9 Metylglukosider derivatiseres med TMS-reagens.

Utstyr

Transferpettor® 100 μ l (Brand)

SMI kapillærrør (blå)

Whirlimixer (Fisons)

Reagenser

TMS-reagens: Trimetylklorosilan (TMCS) (Fluka) 1 ml

Heksametyldisilazan (HMDS) (Aldrich) 2 ml

Pyridin, vannfri (Merck) 5 ml

Prosedyre

1. Avdampete metanoliserte prøver fra metode ble tilsatt 200 μ l TMS-reagens og blandet godt.
2. Prøvene ble satt til henstand i romtemperatur i minst 30 minutter før de ble analysert på gasskromatograf.

Gasskromatografi

Prinsipp

Separasjon av monosakkarider på GC er godt egnet fordi hvert monosakkarid har sitt karakteristiske mønster av topper på GC-kromatogrammet. Hvert monosakkarid har et åpent og to ringstrukturer (furanose- og pyranoseform) som igjen kan ha to isomere former; α - og β -anomer. Disse strukturformene gir opphav til fem ulike metylglykosider. Ved å ta i bruk retensjonstider, arealforhold, intern standard og standardkurver bestemmes kvalitativt og kvantitativt innhold av monosakkarider.

Ved gasskromatografi separeres stoffer i gassform. Flyktigheten til stoffene er temperaturavhengig; ved høyere temperatur øker flyktigheten. På den andre siden begrenses bruk av gasskromatografi ved høy temperatur grunnet fare for degradering av prøve og av prøvens flyktighet. Mobilfasen, også kalt bæregass, er en inert gass som under trykk strømmer gjennom en oppvarmet kolonne. Stasjonærfasen i GC er temperaturstabil væske. Det er få stoffgrupper som kan egner seg som stasjonærfasen siden GC-kolonner kan ha temperaturer opp til 300 °C. En vanlig stoffgruppe som brukes i denne sammenhengen er polysilokaner (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004a).

Prøven løses i et flyktig løsemiddel før den injiseres i en oppvarmet kolonne hvor den fordamper umiddelbart og transporteres til kolonnen av bæregassen. Injiseringen foretas med en sprøyte, og vanlig injiseringsvolum er mellom 0,5-2 μ l. Stoffene fordeler seg mellom stasjonær- og mobilfasen, og deres hastighet gjennom kolonnen blir forskjellig avhengig av deres flytighet, temperatur og retensjon på stasjonærfasen. Denne separasjonen av stoffer detekteres av en flammionisasjonsdetektor (det brukes også andre detektorer), hvor organiske forbindelser brennes opp og det dannes ioner og elektroner. Ved hjelp av spenning på 300 V måles mengden av ladede partikler med strøm. Mengden av organiske forbindelser i prøven er proporsjonal med strømmen som detektoren måler (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004a).

Utstyr

Gasskromatograf:	Carlo Erba 6000 Vega Series 2
Programmeringsenhet:	ICU 600

Integrator:	Chromcard
Detektor:	Flammeionisasjonsdetektor med H ₂ og O ₂ til flammen
Injektor:	Splitt:Splittless (Splittforhold 1:6)
Kolonne:	DB5 Fused silica kapillærkolonne (J&W scientific)
	Lengde: 30 m
	Indre diameter: 0,32 mm
	Filmtykkelse: 0,25 µm
Bæregass:	Helium

Betingelser for GC-systemet

Flow: Gjennom kolonnen:	1,8 ml/min
Splitt flow:	≈ 11 ml/min
Injiseringsvolum:	1,0 µl
Injektortemperatur:	260 °C
Detektortemperatur:	310 °C
Temperaturprogram:	140 °C $\xrightarrow{1^\circ \text{C/min}}$ 170 °C $\xrightarrow{6^\circ \text{C/min}}$ 250 °C

Reagenser

Pyridin (Merck)

Prosedyre

1. Det ble åpnet for gasstrømmene, og GC og integratoren ble programmert.
2. Sprøyten ble skylt et par ganger med pyridin.
3. 1 µl av den TMS-derivatiserte prøven ble injisert.
4. Sprøyten ble skylt med pyridin etter hver prøveinjeksjon.
5. Etter at programmet ble ferdig, noe som tok ca. 50 minutter, ble gassen skrudd av..

5.4 Strukturoppklaring

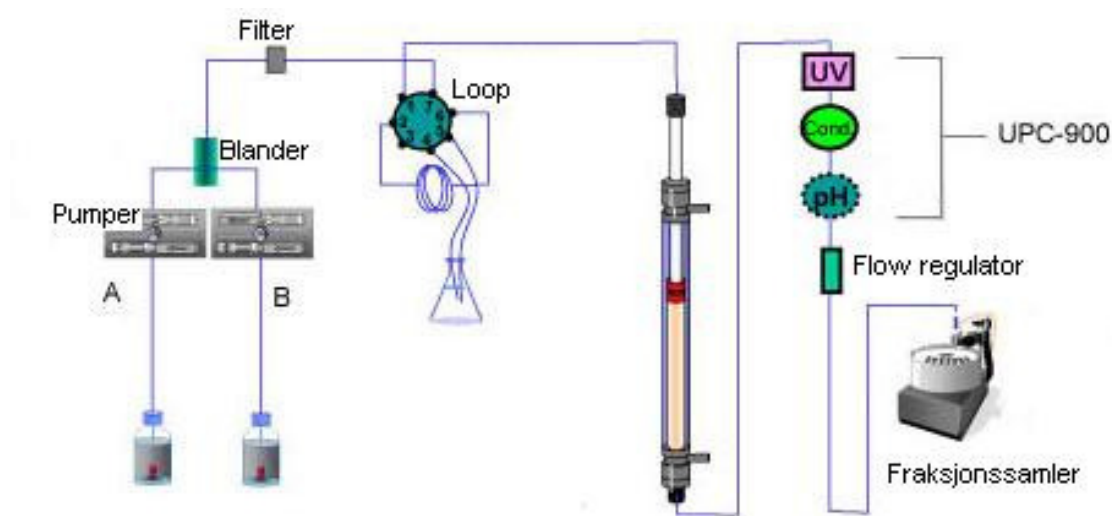
5.4.1 Molekylvektsbestemmelse

Superose 6 10/300 pre packed GL

Prinsipp

Superose ferdigpakket gelfiltreringskolonne består av kryssbundne porøse agarose partikler som har høy fysisk og kjemisk stabilitet. For proteiner er separasjonsområde mellom 5000 og 50 000 Da, og for karbohydrater er dette området mye mindre (GE Healthcare Bio-Sciences AB 2007b). Det er mulig å analysere molekylveksdistribusjon ved å benytte FPLC i kombinasjon med en rekke standarder. Det ble brukt forhåndslegde standardkurver basert på seks dekstranstandarder med kjent molekylvekt.

Figur 5.10 viser oppsettet som ble brukt ved molekylveksbestemmelse. For å kunne gi respons på UV-detektor må forbindelsene kunne absorbere UV-lys. Polysakkarider som inneholder karboksylgrupper og ester kabonyler, som for eksempel pektiner, vil gi absorbans siden C dobbeltbinding til O og oksygenatomer absorberer UV-lys. Responsen gitt i absorbans er proporsjonal med konsentrasjon av UV-absorberende forbindelser i mobilfase, og kan brukes i kvalitative og kvantitative analyser (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004b).



Figur 5.10 FPLC koblet til gelkolonne og UV-detektor (GE Healthcare 2010).

Utstyr

Kolonne:	Superose 6 10/300 pre packed GL (Amersham Bioscience)
	Høyde: 30 cm Diameter: 1 cm
Kolonnevolum:	Ca. 24 ml
FPLC:	Åkta FPLC
Injektor:	Valve Inv-907
Pumpe:	P-920
	Superloop 0,5 ml
Monitor:	UPC-900 (Amersham Pharmacia Biotech)
Fraksjonssamler:	Frac-900 (Amersham Pharmacia Biotech)
Dataprogram:	Unicorn Version 4.0
Detektor:	UV-detektor 214 nm
Skriver:	hpdeskjet 980 cxi
Filter:	Acrodisc® 4 mm Syringe filter 0,45 µm Versapor® Membran (Pall®)
Oppsamlingsrør:	7 ml plastrør (Heger AS)
	Plastsprøyte 1 ml (BD)

Reagenser

10 mM NaCl (aq) (Chemie-Teknik AS)

0,3 M Natriumacetat pH 5,1 justert med 37 % HCl (aq) (Merck)

0,5 M CH₃COOH (aq) (Prolabo)

0,5 M NaOH (aq) (Prolabo)

20 % Etanol (v/v) (aq) (Sigma-Aldrich)

Destillert vann

Alle løsningene ble avgasset (metode 5.1.7 a).

Betingelser

Elueringshastighet:	0,5 ml/min
Fraksjonsstørrelse:	0,5 ml per rør
Prøvens konsentrasjon:	2 mg/ml, 1 mg/ml
Elueringsmiddel:	10 mM NaCl (aq) (Chemie-Teknik AS) 0,3 M Natriumacetat pH 5,1 justert med 37 % HCl (aq) (Merck)

Prosedyre

A: Vasking og klargjøring av kolonnen

1. Kolonnen ble vasket med destillert vann; 1 time med flow 0,2 ml/min, så 76 minutter med flow 0,5 ml/min.
2. Kolonnen ble klargjort med 50 ml 10 mM NaCl (aq) med flow 0,5 ml/min.

B: Applisering og eluering av prøveløsning

1. 2 ml prøveløsning ble laget med konsentrasjon 2 mg/ml.
2. Prøveløsningen ble filtrert 0,45 µm.
3. Superloop ble benyttet ved applisering av prøve.
4. Karbohydratprofil ble bestemt ved hjelp av FS-testen (se metode 5.3.1) og data fra FPLC.
5. Ved eluering med natriumacetat ble det brukt 2 ml prøveløsning med konsentrasjon 1 mg/ml, og punkt 2-4 ble gjentatt.

C: Vask og konservering av kolonnen

1. Etter endt bruk ble kolonnen vasket med 25 ml 0,5 M CH₃COOH (aq) og deretter med 25 ml 0,5 M NaOH (aq) ved 0,5 ml/min.
2. Det ble så vasket med 60 ml destillert vann med flow 0,5 ml/min.
3. Kolonnen ble konservert med 50 ml 20 % etanol (aq) med flow 0,5 ml/min, og lagret ved 4 °C.

5.4.2 Enzymatisk degradering

Prinsipp

Ved å bruke rene spesifikke enzymer kan man analysere strukturen til polysakkarider. Det kan detekteres mulige forskjeller i prøven før og etter enzymdegradering. α -L-arabinofuranosidase brukes for hydrolyse av arabinofuranosyl enheter fra L-arabinose i blant annet polysakkarider. Det arabinan-degraderende enzymet utviser maksimal aktivitet ved pH 4-6, optimal temperatur er 40 – 60 °C, og etter 72 timers inkubasjon er ca 60 % av L-arabinose fjernet (disse betingelsene kan variere avhengig av opprinnelsen til enzymet) (Saha og Bothast 1999). Etter enzymatisk degradering blir de høymolekylære polysakkaridene separert fra de hydrolyserte gruppene ved bruk av PD-10 kolonne (se metode 5.2.5).

Utstyr

Whirlimixer (Fisons)

Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)

Reagenser

50 mM natrium-acetatbuffer(aq) justert med 37 % HCl (aq) (Merck) til pH 4,0

α -L-Arabinofuranosidase: 100 U/ml i 3,2 M ammoniumsulfat LOT: MAF80601

Prosedyre

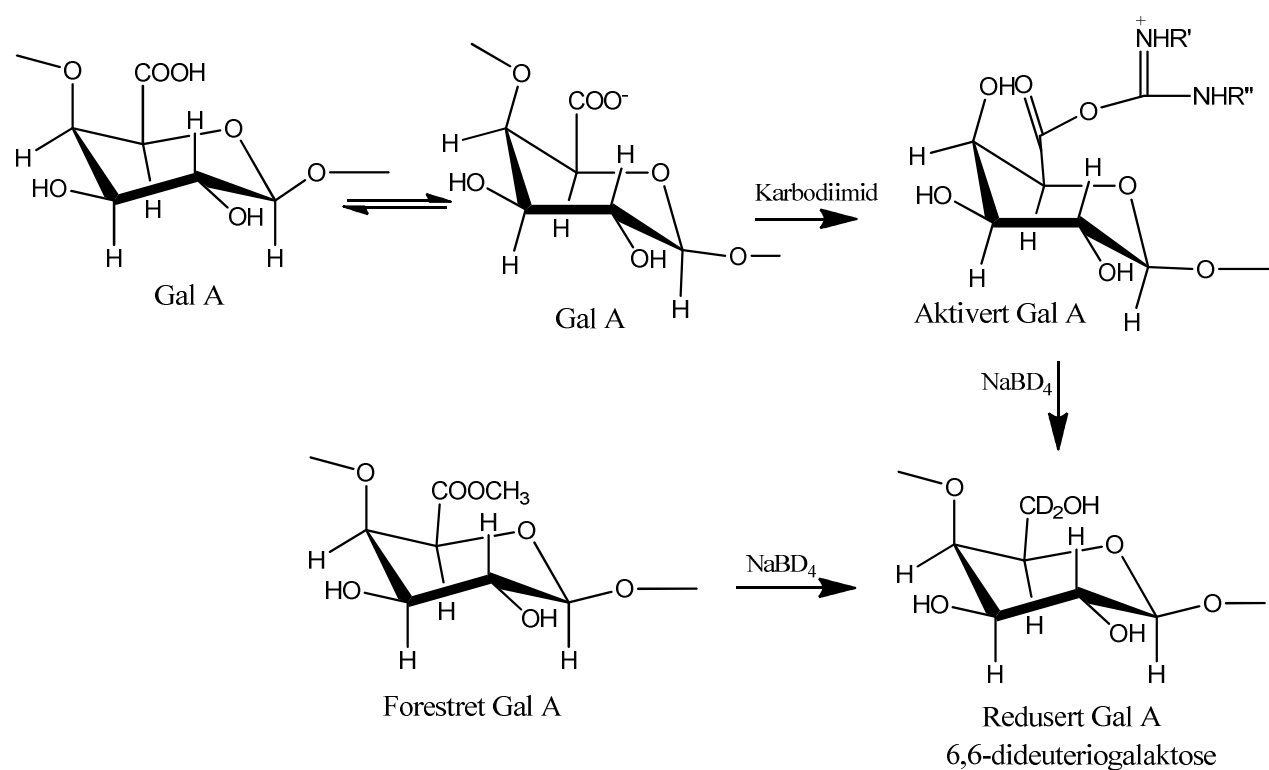
1. 10 mg og 5 mg prøve ble løst i henholdsvis 2 ml og 1 ml buffer.
2. Det ble tilsatt 30 μ l α -L-arabinofuranosidase i prøveløsningen på 2 ml og 15 μ l i den andre.
3. Prøveløsningene ble blandet godt på whirlimixer, og satt i varmeskap ved 40 °C i 72 timer.
4. Etter 36 timer ble det tilsatt 9 μ l av enzymet i prøveløsningen på 2 ml og 4,5 μ l i den andre.
5. For å denaturere enzymet ble prøveløsningene kokt i vannbad i noen minutter.
6. Etter avkjøling ble supernatanten i hver løsning filtrert 0,45 μ m og applisert på PD-10 kolonne (metode 5.2.5).
7. Etter eluering ble prøveløsningene frysetørket (metode 5.1.10).

5.4.3 Metylering

Karboksylysrereduksjon

Prinsipp

Forestrede uronsyrer reduseres i imidazol-buffer med natrium bordeutrid, og danner 6,6'-dideuterio-sukker. De frie uronsyrene må aktiveres først med karbodiimid før reduksjon med natrium bordeutrid, se figur 5.11. Uronsyrer og nøytrale sukker kan skilles på GC-MS-analyser på bakgrunn av forskjell i masse/ladningsforholdet i MS-spekteret (Kim og Carpita 1992).



Figur 5.11 Aktivering og reduksjon av karboksylsyre i fri uronsyre, mens forestret uronsyre reduseres direkte med NaBD₄ (Austarheim 2007).

Utstyr

Syrevaskede metyleringsrør

Dialyseslanger: Spectra/por® MWCO: 3500 Da, d: 29 mm (Spectrum Laboratories Inc)

Plastbøtte

Transferpettor® 100 µl og 200 µl (Brand)

Kapillærrør (blå)

Whirlimixer (Fisons)

Is

Reagenser

500 mM Imidazole-HCl (aq)

NaBD₄ (Aldrich)

0,2 M MES (2-[N-Morpholine] etan svovelsyre)(Sigma)

Carbodiimide (1-cyclohexyl-3-(2-morpholino)carbodiimide-metho-p-toluene sulphonate) (Aldrich)

2 M TRIZMA (tris [hydroksymetyl]aminometan) (Sigma)

0,05 M NaOH (aq) (Prolabo)

Oktanøl

Iseddik (Prolabo)

Destillert vann

Prosedyre

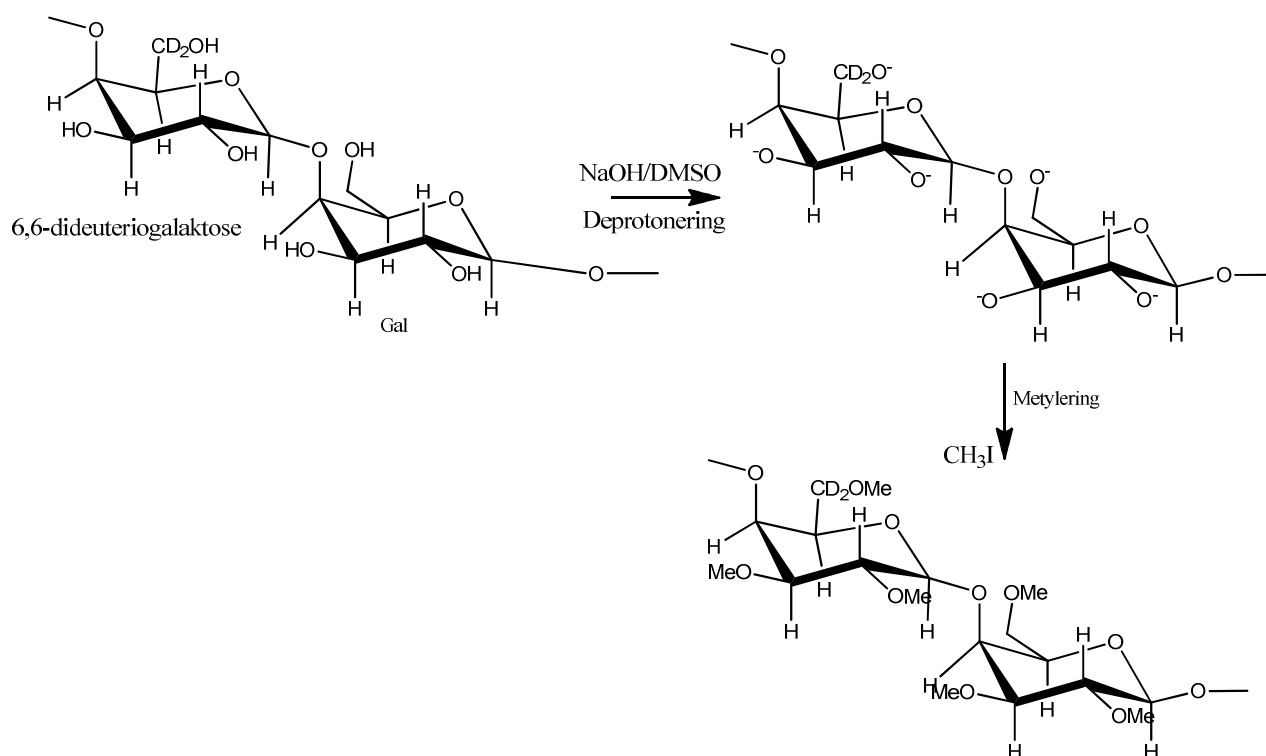
1. 1 mg prøve ble løst i 5 ml 500 mM iskald Imidazole-HCl.
2. Prøven ble redusert ved å tilsette 1 ml nylaget 100 mg/ml NaBD₄ i imidazole-HCl i tre omganger. Etter hver tilsetting ble prøven blandet godt og satt på is, de første to gangene i 5 minutter og i 30 minutter etter siste tilsetting.
3. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved langsom tilsetting av 5 x 100 µl iseddik.
4. Prøven ble dialysert (5.1.13) og frysetørket (5.1.10).
5. Det frysetørkede materialet ble løst i 1 ml vann og tilsatt 200 µl MES og 400 µl av nylaget 500 mg/ml carbodiimide i destillert vann.
6. Løsningen ble blandet godt, og inkubert i 3 timer ved 25-30 °C.
7. Det ble tilsatt 1 ml TRIZMA, 4 dråper oktanøl og prøven ble avkjølt på is.

8. 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBD₄ i 0,05 M NaOH (aq) ble tilsatt i prøven og ble så inkubert over natt ved 4 °C.
9. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av 5 x 100 µl iseddik.
10. Prøven dialysert (5.1.13) og frysetørket (5.1.10).

Metylering

Prinsipp

De frie OH-gruppene i monosakkaridene metyleres ved denne metoden. Dette er ønskelig for OH-gruppene bidrar til høy polaritet av sukkerne, mens ved GC-MS gjøres det analyser på hydrofobe og lettflyktige stoffer. I tillegg vil metylering av de ubundne OH-gruppene bidra til at disse kan skilles fra de bundne OH-gruppene på massespekterene, og strukturen til monosakkaridene kan oppklares, figur 5.12. De frie OH-gruppene på monosakkaridene er svakt sure, og derfor trengs det et sterkt basisk miljø (ved hjelp av DMSO og NaOH) for å ionisere disse. De ioniserte hydroksylgruppene blir metylert etter reaksjon med metyljodid (Ciucanu og Kerek 1984).



Figur 5.12 De reduserte karboksylsyregruppene og de frie OH-gruppene ioniseres før de metyleres.

Utstyr

Transferpettor® 100 µl og 200 µl (Brand)

Kapillærrør (blå)

Whirlimixer (Fisons)

N₂-gassoppsett for inndamping med varmemanteltype Reacti-therm III (Pierce)

Ristemaskin: Vibrax-VXR (IKA Labortechnik)

Agatmorter med pistill

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4 KR

Ultralydbad: Branson 220

Varmeskap: Functionline (Heraeus Instruments)

Reagenser

Dimetylsulfoxid (DMSO) (Merck)

Tørkede NaOH-pellets (Prolabo)

Metyljodid (aq) (Fluka)

Kloroform (Prolabo)

Natriumthiosulfat 5-hydrat (Merck)

Prosedyre

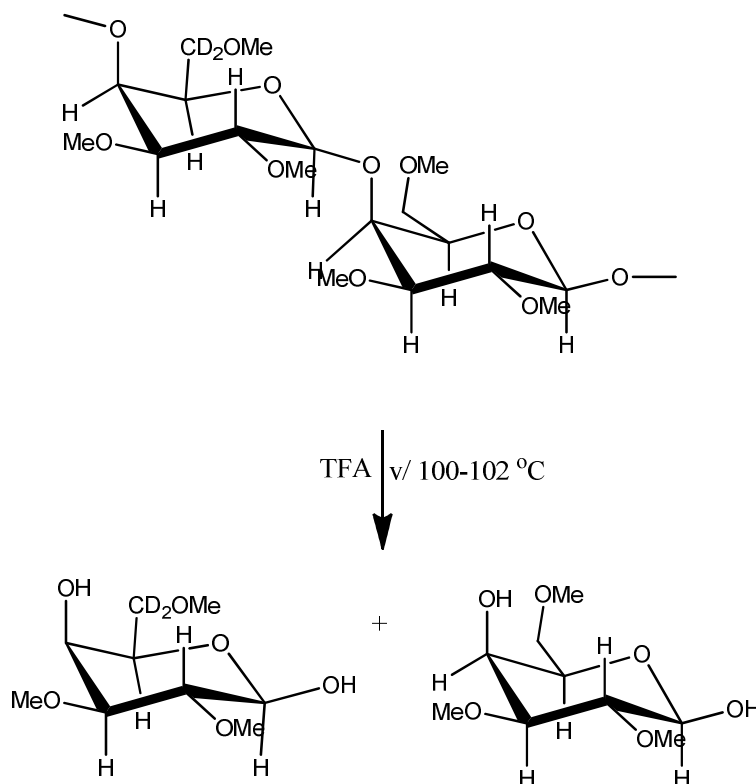
1. Frysetørket prøvemateriale fra karboksylsyre-reduksjon ble tilsatt 500 µl DMSO, og satt på risting ved ca 200 rpm i ca 20 minutter. Prøver som ikke ble løst ble sonikert på ultralydbad i noen minutter.
2. Det ble laget en suspensjon av tørre NaOH-pellets knust i DMSO ved hjelp av agatmorter og pistill. 2 pellets per ml DMSO som gir en konsentrasjon på ca 120 mg/ml.
3. 500 µl av suspensjonen ble tilsatt rett på prøveløsning uten å komme nær glassveggen i røret.
4. Prøven ble blåst med nitrogengass, og ble satt på ristemaskin i en time.
5. Det ble tilsatt 100 µl metyljodid, og ristet videre i 10 minutter.

6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. 200 μ l metyljodid ble tilsatt, og det ble ristet i 20 minutter.
8. 10 ml nylaget 100 mg/ml Natriumthiosulfat i destillert vann og 2 ml kloroform ble tilsatt.
9. Etter at prøven ble blandet godt på whirlimixer (mer enn 40 sekunder), ble den sentrifugert ved 1000 rpm i 3 minutter for å separere fasene.
10. Vannfasen ble fjernet og kastet.
11. Kloroformfasen ble vasket med 4 x 5 ml destillert vann, blandet godt og sentrifugert hver gang. Vannfasen og mellomsljiktet ble fjernet.
12. Kloroformfasen ble overført til et nytt rør og tørket under N_2 -gass.

Hydrolyse

Prinsipp

De metylerte polysakkaridene spaltes til monomerer ved at glykosidbindingene mellom monosakkaridene hydrolyseres i surt miljø, figur 5.13 (Kim og Carpita 1992).



Figur 5.13 Hydrolyse av polysakkarid-kjedene til monosakkarider.

Utstyr

N₂-gassoppsett for inndamping med varmemanteltype Reacti-therm III (Pierce)

Transferpettor® 100 µl og 200 µl (Brand)

Kapillærrør (blå)

Varmeskap: Functionline (Heraeus Instruments)

Reagenser

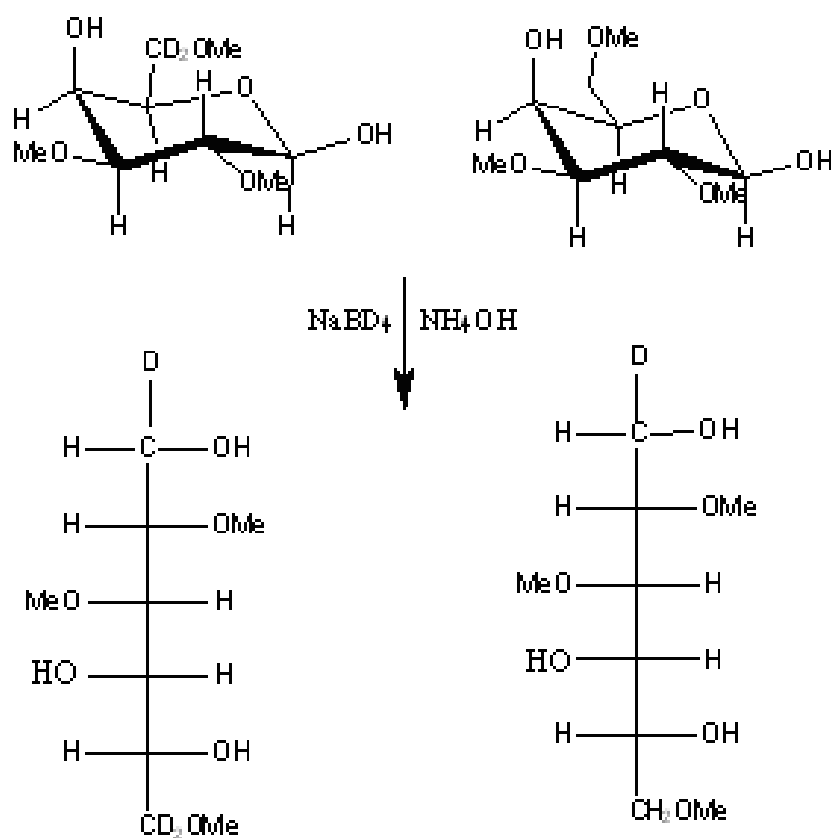
2,5 M Trifluoreddiksyre (TFA) (Merck)

Prosedyre

1. De metylerte prøvene ble tilsatt 500 µl TFA, og gjennomblåst med N₂-gass.
2. Prøven ble hydrolysert ved 100 °C i 2 timer.
3. Prøven ble avkjølt før den ble avdampet med N₂-gass.

Reduksjon**Prinsipp**

Det sykliske hemiacetallet, ved C1 i monosakkaridet, reduseres til alditol og dermed blir ringstrukturen til monosakkaridet brutt, figur 5.14 (Kim og Carpita 1992).



Figur 5.14 Ved denne reduksjonen åpnes monosakkaridenes ringstruktur samtidig som hemiacetallet reduseres til alditol.

Utstyr

Ultralydbad: Branson 220

N₂-gassoppsett for inndamping med varmемanteltype Reacti-therm III (Pierce)

Transferpettor® 100 µl og 200 µl (Brand)

Kapillærrør (blå)

Varmeskap: Functionline (Heraeus Instruments)

Reagenser

2 M NH₃ (aq) (Merck)

NaBD₄ (Aldrich)

Iseddik (Prolabo)

5 % eddiksyre i metanol

Metanol purum destillert (Chemi-teknik AS)

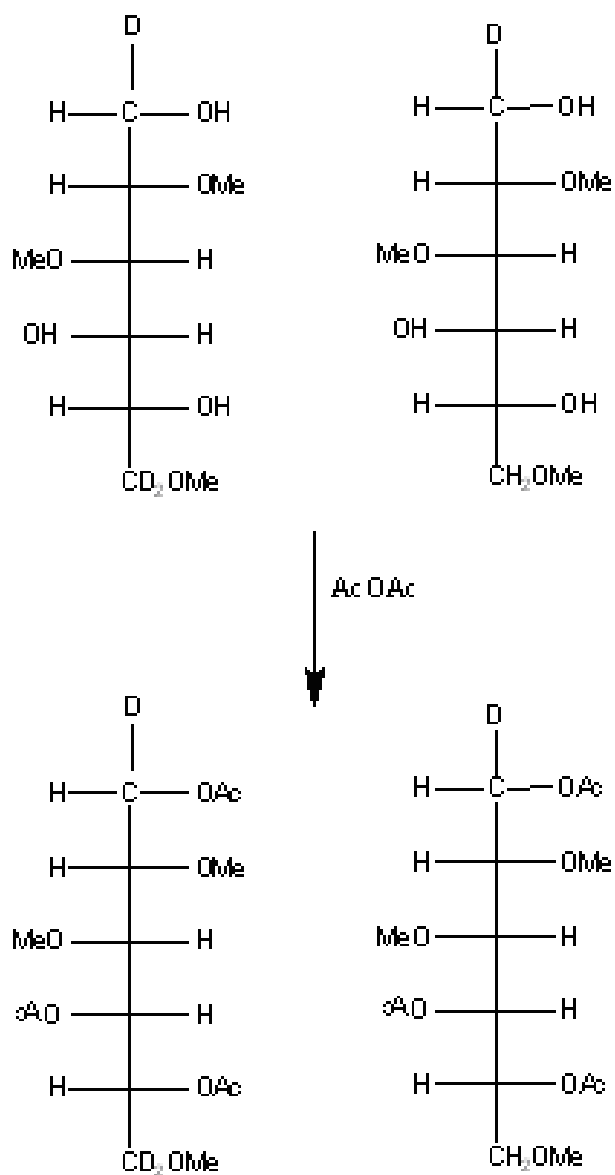
Prosedyre

1. Avdampet prøve fra hydrolyse-trinnet ble tilsatt 500 μ l 2 M NH_3 og 500 μ l nylaget 1 M NaBD_4 i 2 M NH_3 .
2. Løsningen ble sonikert på ultralydbad i 1 minutt før den ble inkubert ved 60 °C i 1 time.
3. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av 3 x 50 μ l iseddik.
4. Prøven ble tørket under N_2 -gass.
5. Det ble tilsatt 2,5 ml eddiksyre (i metanol), og prøven ble tørket med N_2 -gass.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. 2,5 ml metanol ble tilsatt, og prøven ble tørket under N_2 -gass.
8. Punkt 7 ble gjentatt. På dette trinnet er det viktig at all væsken er fordampet.

Acetylering

Prinsipp

I de forrige to trinnene dannes det nye fri OH-grupper på monosakkaridene. Disse blir omgjort til hydrofobe grupper ved at de blir acetykert, slik at separasjonen på GC-MS blir bedre, se figur 5.15 (Kim og Carpita 1992).



Figur 5.15 I det siste trinnet i metylering blir frie OH-grupper, den siste resten av hydrofilisitet i monosakkarider, acetyleret.

Utstyr

Ultralydbad: Bransonic 220

N₂-gassoppsett for inndamping med varmemanteltype Reacti-therm III (Pierce)

Transferpettor® 100 µl og 200 µl (Brand)

Kapillærrør (blå)

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4 KR

Whirlimixer (Fisons)

Supelcorør (syrevasket) med teflonbelagt kork

Reagenser

1-metylimidazol (Fluka)

Eddiksyreanhydrid (Merck)

Diklormetan (Merck)

Metanol purum destillert (Chemi-teknik AS)

Prosedyre

1. De reduserte prøvene ble tilsatt 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml eddiksyreanhydrid. Prøven ble blandet godt på whirlimixer. Hvis krystallene i prøven ikke ble løst, ble dette gjort ved bruk av ultralydbad. Prøven ble satt til henstand i 10 minutter.
2. Overskudd av eddiksyreanhydrid ble ødelagt ved tilsetting av 10 ml vann. Prøven ble blandet godt, og satt til henstand i 10 minutter.
3. De delvis metylerte og delvis acetylerede monosakkaridene ble ekstrahert med 2 x 1 ml vann. Mellom hver ekstraksjon ble prøven blandet godt, sentrifugert og diklormetanfasen ble samlet opp.
4. Den upolare fasen ble tilbakevasket med 2 x 5 ml vann.
5. Diklormetanfasen ble overført til et supelcorør, og tørket under N₂-gass.
6. Før prøven ble analysert ved GC-MS (metode 5.4.4), ble den løst i 50 µl metanol.

5.4.4 GC-MS

GC-MS analysene ble utført av Finn Tønnesen ved Avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo.

De metylerte prøvene fra metode 5.4.3 ble analysert på GC-MS. MS gir kvalitativ og kvantitativ informasjon og er et godt verktøy for strukturoppklaring av stoffer. Først blir prøven separert på GC (se metode 5.3.2), og deretter detektert av MS. I massespekterometeret blir molekylene ionisert og fragmentert. Massespekteret viser hvilke ioner som dannes, og deres masse/ladning-ratio.

Utstyr og betingelser

GC-MS:	GC 8000 Series
Detektor:	Fisons Instruments, MD 800
Injektor:	Splitt (1:10)
GC-kolonne:	FactorFOUR™, VF-1ms
	Filmtykkelse: 0,25 µm
	Indre diameter: 0,25 µm
	Lengde: 30 m
	Injektortemperatur: 250 °C
	Temperaturområde: 80-280 °C
Dataprogram:	Masslab 73
Viktige ioner:	45, 47, 117, 118, 161, 162, 189, 190, 205, 207, 233, 234, 235, 261, 262, 305, 307
Temperaturprogram:	80 °C $\xrightarrow{30\text{ °C/min}}$ 170 °C $\xrightarrow{0,5\text{ °C/min}}$ 200 °C $\xrightarrow{30\text{ °C/min}}$ 280 °C

5.5 Immunmodulerende aktivitet

5.5.1 Komplementfikseringstest

Prinsipp

Komplementsystemet er en viktig del av det medfødte immunsystemet, og har også en kobling til det ervervede immunsystemet. Komplementfikseringstest benyttes for å undersøke immunmodulerende aktivitet av polysakkarider (Michaelson et al 2000).

Først blir komplement inkubert med prøvematerialet, som enten aktiverer eller hemmer komplement. Deretter bindes komplement til SRBC, sensibiliserte røde blodceller fra sau som er dekket med antistoff fra kanin. Den sistnevnte koblingen fører til hemolyse. Hvis komplement er intakt vil den hemolysere erytrocyttene. Positivt utslag (prøven påvirker

komplement) i testen gir hemming av hemolyse. Testens "antikomplementære aktivitet", hemming av hemolysen, inkluderer både aktivering og hemming av komplementsystemet. Komplementaktivatorer fører til reduksjon i hemolyse fordi komplement konsentrasjonen reduseres ved at komplementsystemet aktiveres. Mens komplementhemmere gir hemming av hemolyse fordi en bestemt trinn i komplementsystemet hemmes. Parameteren som måles er konsentrasjon av polysakkarider/prøve som er nødvendig for å hemme 50 % av hemolysen (ICH₅₀) (Yamada og Kiyohara 1999).

Utstyr

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 3 SR+

Varmeskap med ristepate: Termaks, 37 °C

Mikroplateleser: Thermomax

Whirlimixer, Heidolph Reax 2000

Mikrotiterplater med 96 brønner, rund/flat bunn

Finn®-pipetter med spisser

Reagenser

Destillert vann

Fosfatbuffer: PBS 14/150 pH 7,4 Autoklavert 0512049-A 15.09.05, åpnet 22.01.08

Veronal/BSA-buffer: CFT (pH 7,2) med 2 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) og 0,02 % Natriumazid. Autoklavert 11.05.09

Saueblod: Hvit 161 06.08.09, Hvit 152 10.12.09

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor, fortynnet 1:10 i veronalbuffer

Komplementkilde: Blod 147, Serum fra ECG (humant). Tappedag 25.09.08, 14.02.08

Standard: *Plantago Major* L., fraksjon II (PMII)

Prosedyre

A: Vasking av saueblodceller før sensibilisering

1. 100 µl blod per mikrotiterplate ble tatt ut fra bunnen av reagensglasset.
2. Blodcellene ble vasket to ganger med fosfatbuffer og en gang med veronal/BSA-buffer. Det ble sentrifugert mellom hver vask, og vaskevannet ble fjernet hver gang.

B: Sensibilisering saueblodceller

1. 15 µl Virion 9020 Amboceptor, 60 µl pakkeblodceller og 5,925 ml veronal/BSA-buffer ble inkubert under resting i 30 minutter ved 37 °C.
2. Løsningen ble vasket to ganger med fosfatbuffer og en gang med veronal/BSA-buffer. Det ble sentrifugert mellom hver vask, og vaskevannet ble fjernet hver gang.
3. Blodet ble fortynnet med 5,940 ml veronal/BSA-buffer, dermed ble det laget en 1 % løsning av blodceller.

C: Fortynning av prøver

1. Ca. 1 mg frysetørket prøve og standard ble løst i veronal/BSA-buffer til en stamløsning med utgangskonsentrasjon 1 mg/ml.
2. En 4-folds fortynningsrekke ble laget, tabell 5.1, dette ga 6 fortynninger av standard og av hver prøve.

Rør #	Konsentrasjon (µ/ml)	
Rør 1	500 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra stamløsningen
Rør 2	125 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 1
Rør 3	31 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 2
Rør 4	8 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 3
Rør 5	2 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 4
Rør 6	0,5 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 5

Tabell 5.1 Fortynningsrekke av prøve med veronal/BSA-buffer som fortynningsvæske.

D: Titreringskurve for komplementkilden

1. 6 brønner på mikrotiterplaten ble fylt med 100 µl destillert vann (100 % lyse) og 24 brønner med 50 µl veronal/BSA-buffer (3 brønner per fortynning av komplement/buffer).
2. 6 brønner ble fylt med 100 µl veronal/BSA-buffer (kontroll), og i 6 brønner ble det tilsatt 150 µl veronal/BSA-buffer (blank).

3. Det ble laget en fortynningsrekke av komplement og buffer etter tabell 5.2.
4. 50 µl komplement/buffer tilsettes brønnene med 50 µl veronal/BSA-buffer.
5. Mikrotiterplaten dekket med bred, blank tape for å unngå fordamping, og settes på risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. Det tilsettes 50 µl 1 % SRBC i alle brønnene unntatt blank-brønnene, og platen blir inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
7. Platen ble sentrifugert i 5 minutter ved 1000 rpm.
8. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate, og platen ble igjen sentrifugert for å fjerne luftbobler.
9. Absorbansen ble avlest ved 405 nm på en mikroplateleser.
10. Den fortynningen av komplement/buffer som ga 50 % lyse av SRBC ble brukt videre.

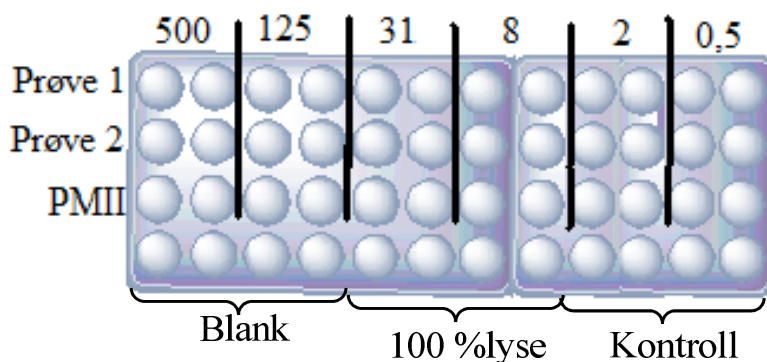
Komplement:buffer	Komplement (µl)	Veronal/BSA buffer (µl)
1:40	10	390
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090

Tabell 5.2 Tillaging av fortynningsrekke av komplement.

E: Utførelse av testen

1. 50 µl av hver fortynning av prøven (2 paralleller av hver fortynning) tilsettes en brønn i en mikrotiterplate med runde brønner (96 brønner).
2. 4 brønner ble tilsatt 100 µl destillert vann (100 % lyse), 4 brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA-buffer (kontroll) og 4 brønner ble tilsatt 100 µl veronal/BSA-buffer (blank), se figur 5.16.
3. 50 µl fra komplementløsningen ble tilsatt hver brønn, bortsett fra 100 % lyse-brønnene og blank-brønnene.

4. Platen ble dekket med bred, blank tape for å hindre fordamping, og platen ble satt på risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. 50 µl 1 % sensibiliserte blodceller ble tilsatt i hver brønn, og ble inkubert ved risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. Platen ble sentrifugert i ca. 5 minutter ved 1000 rpm.
7. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate, og ble sentrifugert.
8. Absorbansen ble avlest ved 405 nm.



Figur 5.16 Oversikt over brønnene ved utførelse av komplementfikseringstesten. De tre øverste radene viser to paralleller av hver av de 6 fortynningene (500- 0,5 µg/ml) av prøvene.

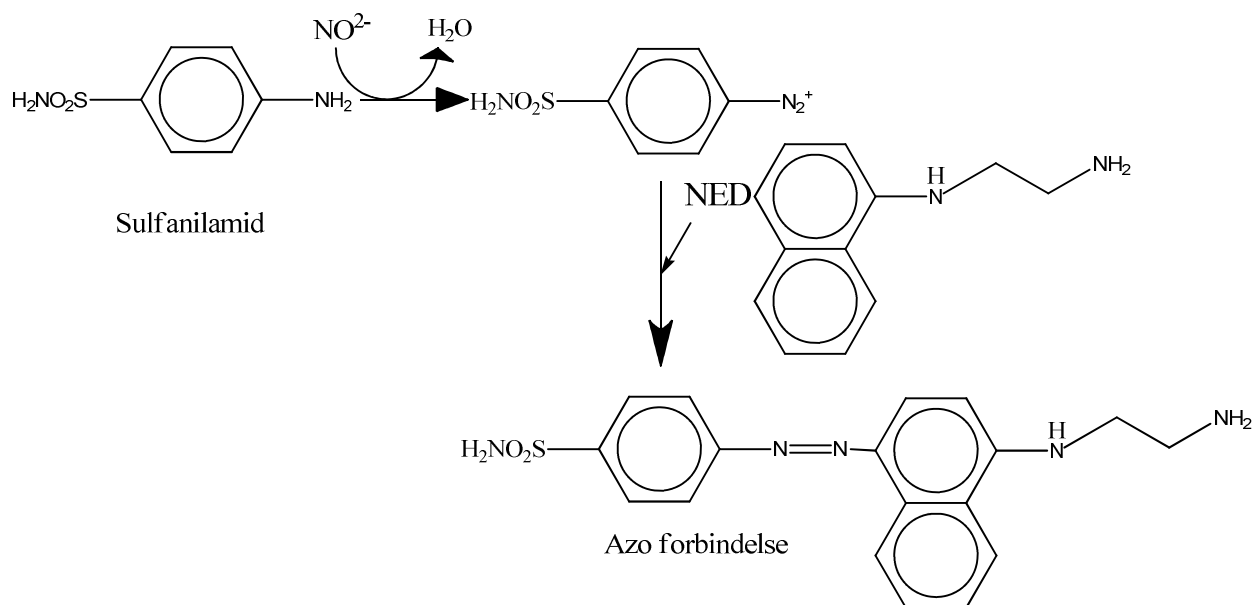
5.5.2 NO-frigjøring fra makrofager

Prinsipp

Denne testen ble utført av Kari Inngjerdningen på Rikshospitalet 2010.

Nitrogenoksid (NO) er en viktig fysiologisk budbringer og signaltransmitter i mange biologiske systemer, blant annet i immunoogiske vev. Når makrofager aktiveres, frigjør de NO (Promega Corporation 2009).

NO har to nedbrytningsprodukter, et av dem er nitritt (NO_2^-) som er stabil og ikke-flyktig. Ved å måle nitritt kan man undersøke NO-dannelse som er korrelert med makrofagaktivering. Nitritt danner en farget azo-forbindelse når det reagerer med sulfanilamid og N-(1-naptyl)etylendiamin i surt miljø, se figur 5.17. Absorbansen av den fargede komponenten avleses ved 540 nm (Promega Corporation 2009).



Figur 5.17 Dannelse av azo forbindelse etter at Griess reagens har reagert med NO_2^- (Promega Corporation 2009).

Utstyr

Celleteller: Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter)
 Sentrifuge: Rotina 420 R (Hettich)
 Celleinkubator skap med CO_2 -kontroll (Forma Scientific)
 Absorbansmåler: Titertek multiskan
 Mikrotiterplater med flat og rund bunn

Reagenser

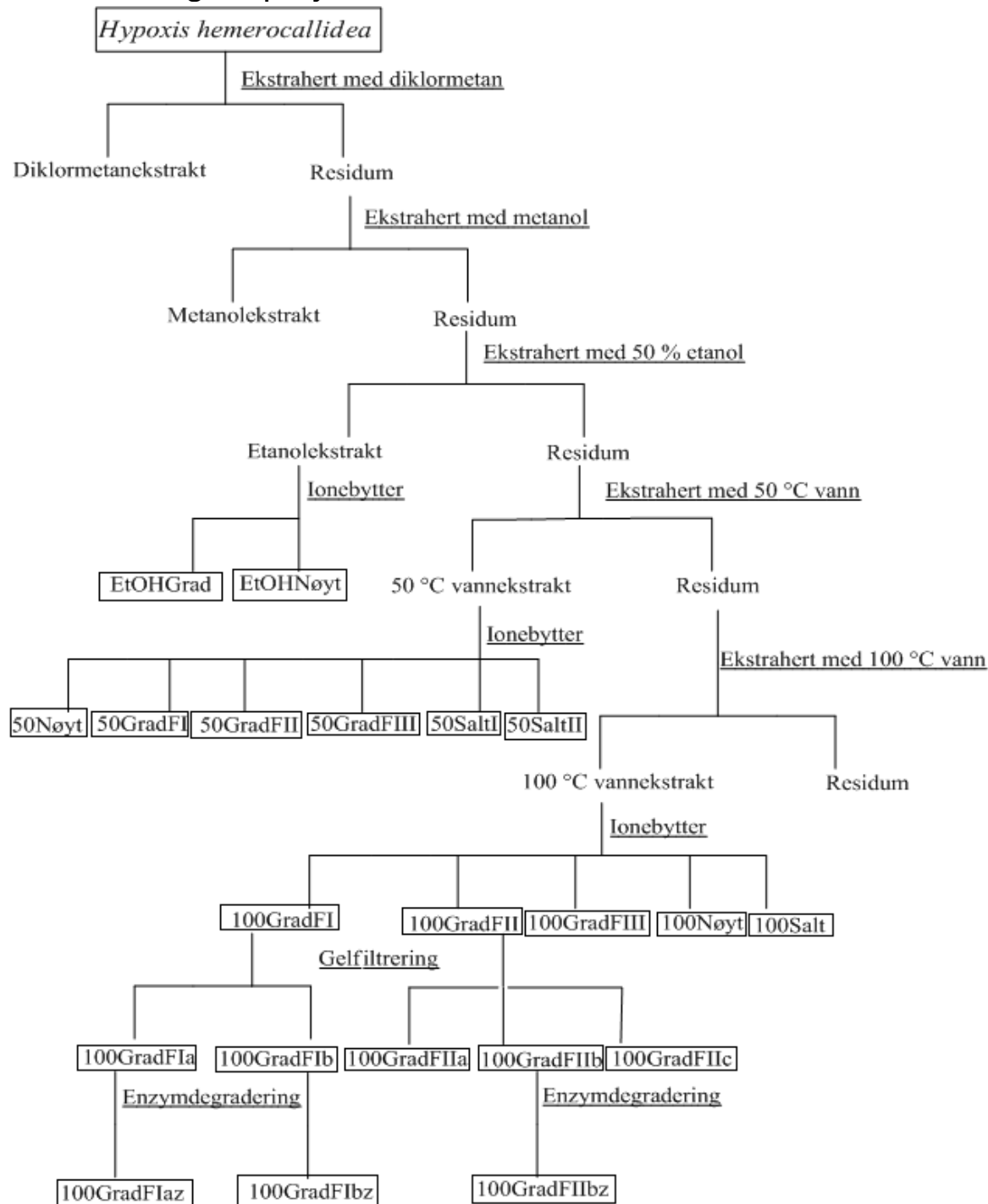
Dyrkningsmedium: RPMI 1640 tilsatt 10 % kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin og 2 mM L-glutamin, $5 \cdot 10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol
 Griess-reagens A: 1 % sulfanilamid (i 5 % fosforsyre)
 Griess-reagens B: N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) i destillert vann
 Cellelinje: RAW 264,7 derivert fra musemakrofager
 Positiv kontroll: LPS (lipopolysakkarid), PM-II fra *Plantago major*

Prosedyre

1. Makrofager ble høstet fra cellekultur. For å telle cellene ble 20 μ l celleduspensjon tilsatt 10 ml isoton buffer II. Cellene ble telt i coulter counter.
2. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 5 minutter.
3. Cellene ble resuspendert i dyrkningsmedium til konsentrasjon på 500 000 celler/ml.
4. Det ble laget følgende fortynningsrekke av prøvene: 5 mg/ml, 500 μ g/ml og 50 μ g/ml. Det ble laget 2 paralleller av hver fortynning.
5. Det ble tilsatt 2 μ l prøve til hver brønn. Som positive kontroller ble 2 paralleller med 5 μ l LPS (10 ng/ μ l) og 2 paralleller med 5 μ l av PMII (2 mg/ml) benyttet. Rent medium ble benyttet som negativ kontroll. Det ble brukt flatbunnet mikrotiterplate.
6. 100 μ l celleduspensjon (=50 000 celler) ble tilsatt hver brønn. Sluttkonsentrasjon av prøvene: 100 μ g/ml, 10 μ g/ml og 1 μ g/ml.
7. Cellene ble inkubert ved 37 °C i en celleinkubator med 4 % CO₂ i ca. 24 timer.
8. Supernatanten ble overført til rundbunnet mikrotiterplate og sentrifugert ved 1400 rpm i 2 min.
9. 50 μ l av supernatanten ble overført til flatbunnet mikrotiterplate.
10. Det ble laget en standardkurve med fortynninger av 100 mM NaNO₂ (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 μ M). Disse ble behandlet likt som prøvene. Grunnet endringer i farge må det lages en nitritt-standardkurve for hvert assay.
11. 50 μ l Griess reagens A ble tilsatt hver brønn.
12. Platen ble satt mørkt i 10 min.
13. 50 μ l Griess reagens B ble tilsatt hver brønn.
14. Absorbansen ble målt ved 540 nm.

6. Resultater og diskusjon

6.1 Isolering av polysakkarider



Figur 6.1 Oversikt over isolering, opprensing og fraksjonering av polysakkaridene i *H. hemerocallidea*.

6.1.1 Ekstraksjon

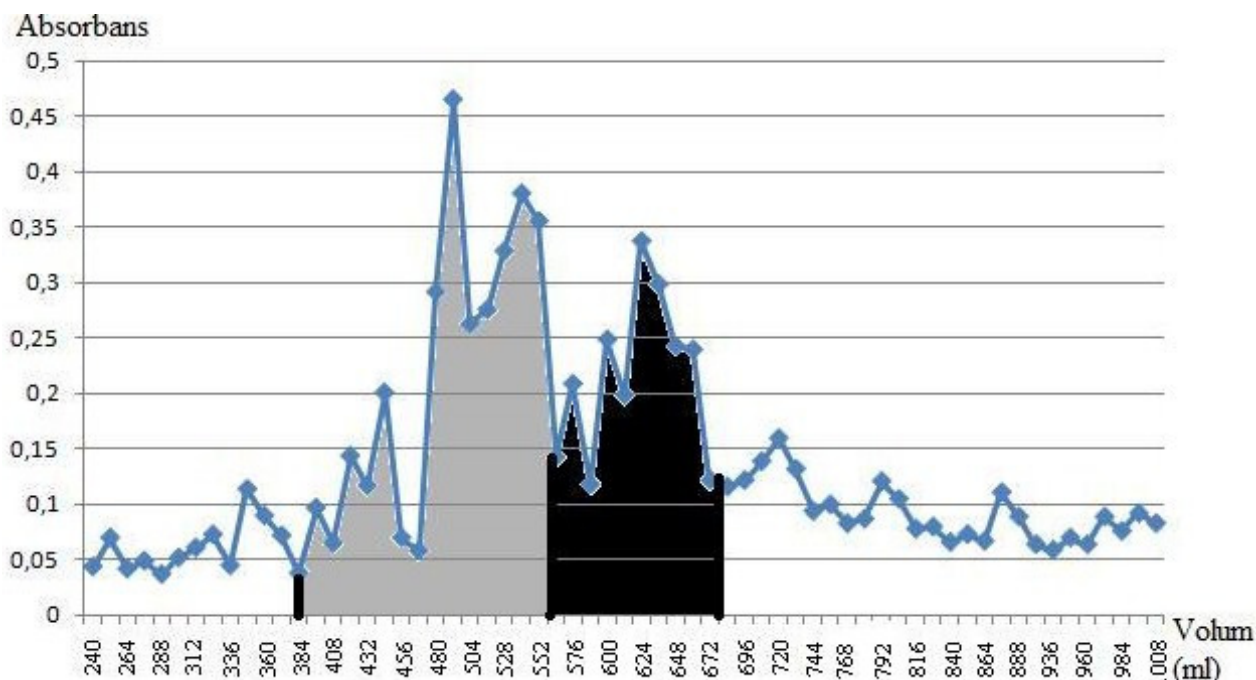
Plantematerialet ble kjøpt februar 2009 fra en herbalist (plantesamler), og identiteten ble bekreftet av kuratoren ved UWC (University of the Western Cape) Herbarium i Sør-Afrika. Det er kjent at herbalistene "importerer" denne planten fra østsiden av landet siden den ikke vokser på vestsiden. Etter høsting blir plantematerialet, de underjordiske delene av planten, oppbevart ved romtemperatur, ca. 25 °C, og kan brukes i opptil noen måneder. Etter at plantematerialet (jordknoll) ble kjøpt inn, ble det delt i 5 mm tykke biter som ble umiddelbart lagt i flytende nitrogen før de ble frysetørket i en bulk over 96 timer. Dette frysetørkede materialet ble knust til mindre biter, og ca. 438 g av dette ble ekstrahert med diklormetan og deretter med metanol, for å fjerne upolare og lavmolekylære forbindelser (metode 5.2.1). Etter tørking av prøvematerialet ble det ekstrahert med 50 % etanol (metode 5.2.2). Arabinogalaktan kan i noen tilfeller være bundet til proteiner, og ved bruk av ekstraksjon med 50 % etanol vil disse forbindelsene spaltes av fra proteinet (Brummer og Cui 2005). Plantematerialet ble deretter ekstrahert med 50- og 100 °C vann (metode 5.2.3). Etanol- og vannekstraktene ble brukt til videre studier. Figur 6.1 oppsummerer isolering og fraksjonering av de ulike polysakkaridene i *H. hemerocallidea*.

6.1.2 Ionebytterkromatografi

Etanol-, 50- og 100 °C vannekstrakter ble applisert på ionebytterkolonnen ANX Sepharose 4 Fast flow. Dette ble utført for å kunne separere sure og nøytrale polysakkarider. Med destillert vann ble det eluert ut nøytrale, mens NaCl-gradient (0-1,5 M) ble benyttet for eluere de sure polysakkaridene. Etter gradienteluering elueres det med 2 M NaCl. Ofte har fraksjonene fra 2 M NaCl mer sure grupper enn fra gradienteluering. FS-testen (metode 5.3.1) ble benyttet for å bestemme innholdet av karbohydrat i eluatene fra de ulike ekstraktene, og deretter fraksjonere eluatene slik vist på figur 6.2. Alle fraksjoner ble dialysert og frysetørket. Fraksjoner med stort volum ble avdampet på rotavapor før dialyse.

Etanolekstraktet var veldig viskøst og veldig mørkt, nesten svartfarget. Selv om ekstraktet ble dampet av på rotavapor og ble dialysert, forble løsningen viskøst. Grunnet den høye viskositeten ble volumreduksjon vanskelig, og volumet 1.2 liter, ble større enn fra de andre ekstraktene. Etanolekstraktet ble applisert to ganger på kolonnen. Dette ga fraksjonene EtOHgrad (fra 0-1.5 M NaCl gradient) og EtOHnøyt (fra eluering med vann).

50-og 100 °C vannekstrakter var brune, og var etter volumreduksjon henholdsvis på 0.6 liter og 0.5 liter. Fra 50 °C vannekstrakt fås disse fraksjonene fra gradienteluering: 50GradFI, 50GradFII 50GradFIII. Det samme ekstraktet ga to fraksjoner fra 2 M NaCl-eluering, 50SaltFI og 50SaltFII, og en fraksjon fra eluering av nøytrale sukker. Som figur 6.2 viser gir 100 °C vannekstrakt to fraksjoner etter gradienteluering. I tillegg fås en fraksjon fra eluering med 2 M NaCl, og en fraksjon bestående av nøytrale sukker.



Figur 6.2 Karbohydratelueringprofilen til 100 °C vannekstrakt etter eluering med NaCl-gradient på ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub). Det grå området ble slått sammen til 100GradFI, mens det sorte området ble slått sammen til 100GradFII.

Alle fraksjonene ble dialysert og frysetørket, utbyttet vises på tabell 6.1. Alle fraksjoner tilhørende 100 °C vannekstrakt har høyest utbytte, dette stemmer med at løseligheten til polysakkarider øker med temperaturen. Fraksjoner derivert fra 50 °C vannekstrakt har minst polysakkarider, mens etanol-ekstraktet ga middels store mengder med polysakkarider. Både 50SaltFI og 50SaltFII var brune, og det ble bestemt å ikke bruke disse videre grunnet lite mengde. 50Nøyt ble også forkastet siden den var svart og ville by på vanskeligheter ved analyse. Alle tre fraksjonene fra gradienteluering av 50 °C vannekstrakt var beige, unntatt 50GradFII som var mørkebrunt. 100GradFI og 100GradFII var brune, mens 100Salt var svak brunt. EtOHNøyt og EtOHGrad var henholdsvis brun og lyse brun.

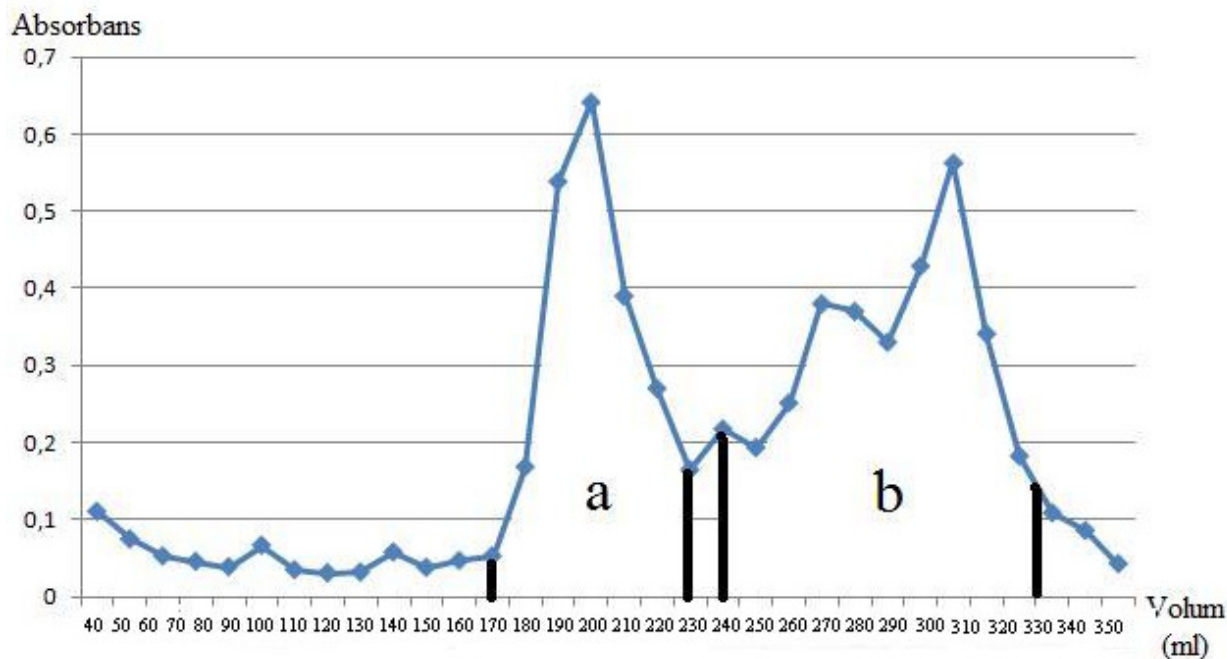
Fraksjon	Utbytte (mg)	Fraksjon	Utbytte (mg)
50GradFI	26,0	100GradFI	314,3
50GradFII	33,4	100GradFII	126,8
50GradFIII	35,4	100Salt	76,1
50SaltFI	21,2	100Nøyt	365,9
50SaltFII	10,5	EtOHGrad	97,9
50Nøyt	110	EtOHNøyt	130,8

Tabell 6.1 Alle fraksjonene og deres utbytte etter eluering med ionebytterkolonne.

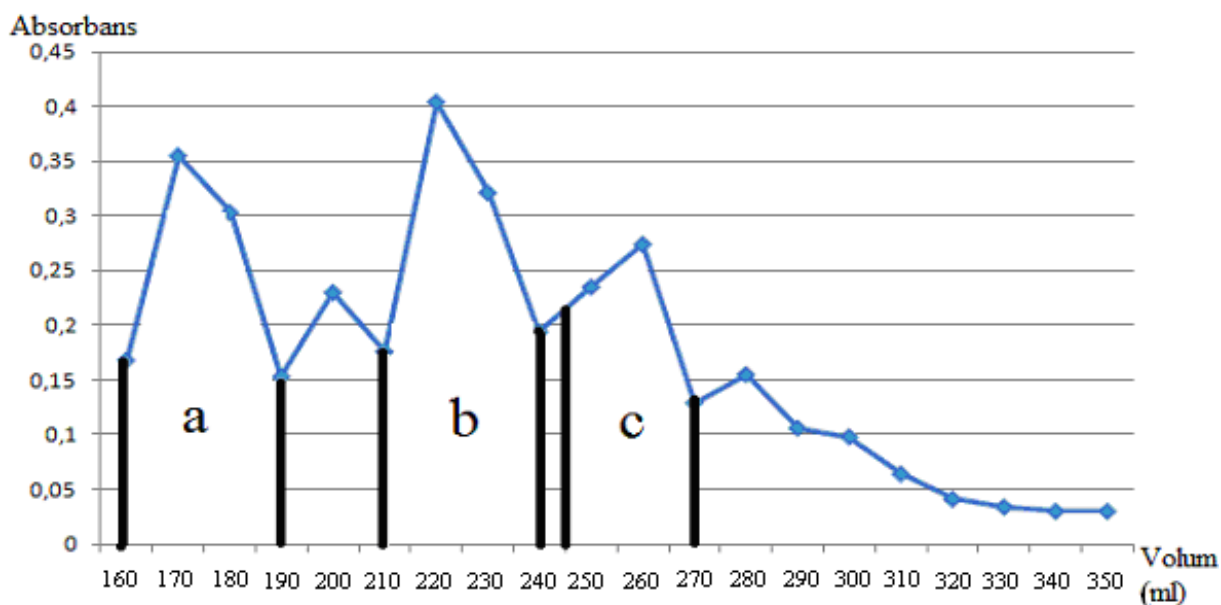
Ved å se tabell 6.1 i lys av figur 6.12 og 6.13 ser man det er en viss sammenheng mellom mengde polysakkarid og komplementfikserende aktivitet. For eksempel har 100GradFI veldig høyt utbytte og utviser ganske høy aktivitet i komplementfikserende testen. Selv om gradientfraksjonene fra 50 °C vannekstrakt har lite utbytte, har disse en del aktivitet. Man ser ikke direkte proporsjonalitet mellom mengde utbytte og aktivitet. Men man får en pekepinn om at polysakkaridene i *H. hemerocallidea* kan være bioaktive.

6.1.3 Gelfiltrering med Sephacryl S-200

100GradFI og 100GradFII ble valgt til rensing videre på gelfiltreringskolonnen Sephacryl S-200. Disse fraksjonene ble valgt på bakgrunn av mengde karbohydrat (fra FS-test), mengde stoff (tabell 6.1) og aktivitet i komplementfikseringstesten (metode 5.5.1). Figur 6.3 og 6.4 gir et indisium på at disse to fraksjonene inneholder relativt mye sukker, og figur 6.12 viser at de er en av de mest aktive i komplement-testen.



Figur 6.3 Karbohydratprofil etter eluering av halve volumet til 100GradFI på gelkolonnen. Pprofilen etter eluering av andre halvdel av 100GradFI var liknende. Eluatene fra begge appliseringene ble delt i to og sammenslått; 100GradFIa, og 100GradFIb.



Figur 6.4 Karbohydratprofil etter eluering av 100GradFII på gelkolonne. Denne prøven ble fraksjonert i tre deler.

Polysakkaridene til 100GradFI og 100GradFII elueres ut forholdsvis ved samme elueringsvolum (se figur 6.3 og 6.4), men 100GradFI har lengre hale. I disse to figurene kan det observeres at 100GradFIIa og 100GradFIIb er eluert ved nesten samme volum som

100GradFIa, med andre ord disse to fraksjonene har liknende molekylstørrelse og er høymolekylære polysakkarider. 100GradFIb og 100GradFIc har lavere molekylvekt enn de andre tre fraksjonene. Sephacryl S-200, brukt til gelfiltrering, har fraksjoneringsområde mellom 1-80 kDa. Molekyler som er større enn 80 kDa, vil elueres ut med voidvolumet. Denne gelfiltreringskolonnen har separert polysakkaridene godt. Den første toppen i fraksjon 100GradFIIa, se figur 6.4, starter brått. Dette gir en mistanke om at den første absorbansavlesningen kan egentlig være større enn 0,17 i absorbans slik at toppen starter tidligere enn ved 160 ml. Ved å sammenligne tabell 6.2 med figur 6.3 og 6.4 ser man at AUC (arealet under kurven) til 100GradFIIa og 100GradFIb er relativt likt, men 100GradFIb har dobbelt så mye polysakkarider som 100GradFIIa. 100GradFIa og 100GradFIb har mye større AUC enn 100GFIIb, men alle tre ga nesten like mye utbytte (tatt i betraktning at mengdene til 100GradFIa og 100GradFIb er fra to appliseringer). Dette tyder på at FS-testen ikke kan brukes direkte til kvantitative målinger av polysakkarider i blanding da ulike sukkere har ulik absorbans ved samme bølgelengde (Brummer og Cui 2005).

Hvis man sammenligner figur 6.15 og tabell 6.2 ser man tydelig at mengde polysakkarid er proporsjonal med komplementfikserende aktivitet. 100GradFIb skiller seg ut i denne sammenhengen. Fra tabell 6.4 ser man at denne fraksjonen har størst innhold av 1→4 bundet galakturonsyre av alle fraksjonene, hovedkomponenten i glatte områder. Homogalakturenan har nedregulerende effekt på immunmodulerende aktivitet.

Fraksjon	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
100GradFIa	52,1	16,6
100GradFIb	49,0	15,6
100GradFIIa	14,5	11,4
100GradFIb	26,3	20,7
100GradFIc	18,8	14,8

Tabell 6.2 De ulike fraksjonene etter gelfiltrering. Prosent utbytte er regnet ut ifra materiale applisert på kolonnen.

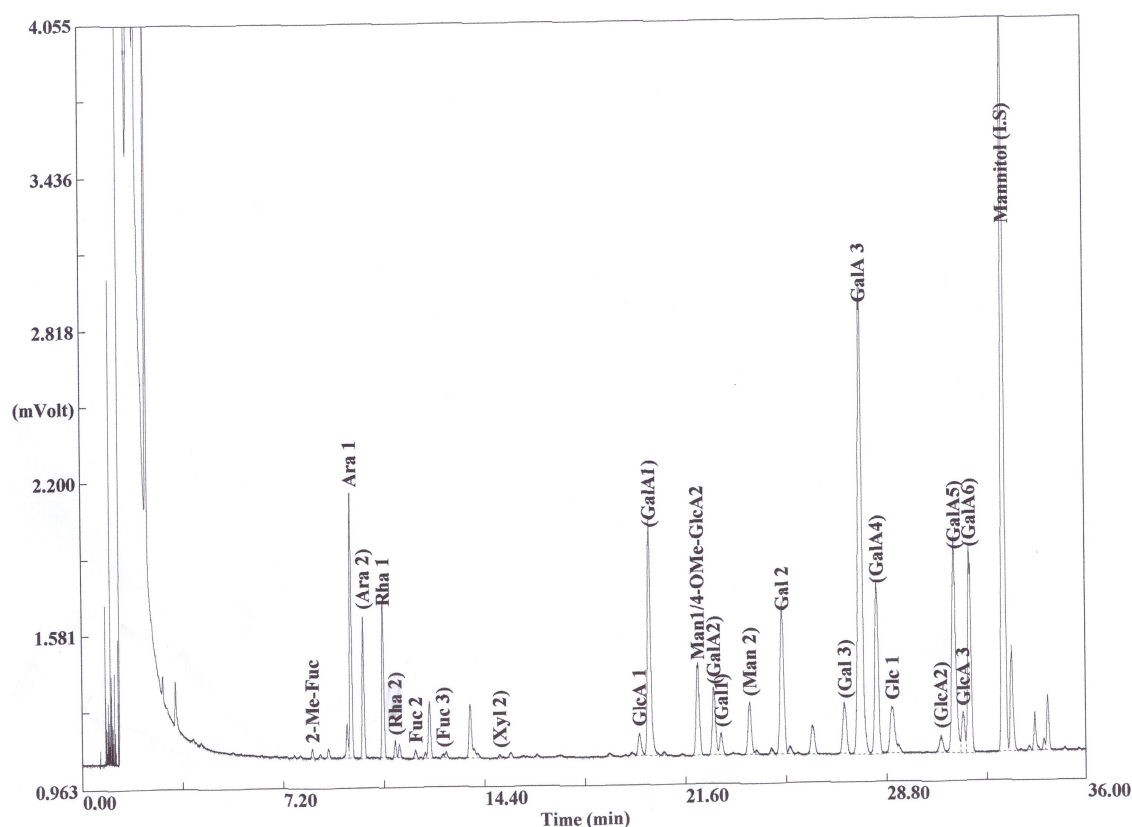
Tabell 6.2 viser at mengden (i mg) av fraksjonene 100GradFIa og 100GradFIb er større enn de andre fordi 100GradFI ble applisert i to omganger på gelfiltreringskolonnen. Hvis hele

100GradFI på 314,3 mg ble løst i 15 ml vann, ville løsningen bli veldig viskøs og elueringen av polysakkaridene kunne ikke skje optimalt.

6.2 Strukturoppklaring

6.2.1 Monosakkaridanalyse

Monosakkaridsammensetning til følgende fraksjoner ble analysert, etter metanolyse og TMS-derivatisering, på GC: 50GradFI, 50GradFII, 50GradFIII, EtOHNøyt, EtOHGrad, 100Salt, 100Nøyt, og alle fem fraksjoner etter gelfiltrering av 100GradFI og 100GradFII. Da hvert monosakkarid gir karakteristiske topper basert på konformasjoner, ble kromatogram fra GC-analyse tolket, sammen med forhåndslagde standardkurver for monosakkarider, for kvalitativ og kvantitativ monosakkaridbestemmelse. Et eksempel på et slikt kromatogram vises på figur 6.5, monosakkaridsammensetningen til 100GradFIIC.



Figur 6.5 Monosakkaridsammensetningen til 100GradFIIC med karakteristiske topper navngitt.

Monosakkaridsammensetningen til prøvene som ble analysert på GC foreligger i tabell 6.3. Den totale mengden monosakkarid i alle prøvene er rimelig høyt, den laveste mengden karbohydrat er på 50,7 %. Alle fraksjonene har en del arabinose, men 100Salt og EtOHNøyt skiller seg veldig ut med sine store mengder arabinose. Disse to fraksjonene har totalt sukkerinnhold på henholdsvis 163,5 % og 125,9 %, og dermed blir mengdene til noen av monosakkaridene mye større enn i de andre prøvene. I praksis er det ikke mulig å ha mer enn 100 % karbohydrat i en prøve, men beregninger kan gi tall over 100 % blant annet fordi man bruker intern standard. Det er kritisk at mannitol, intern standard, blir tilsatt veldig nøyaktig for dette påvirker resultatet. I tillegg har man usikkerhet ved veiing av prøvematerialet, som kan virke inn på utregning av total mengde karbohydrat i fraksjonen.

Generelt ser man relativt mye arabinose og galaktose i alle prøvene, som sammen danner arabinogalaktaner. I tillegg er det mye av galakturonsyre, opptil 61 %, i de fleste av fraksjonene. Dette indikerer at polysakkaridene er av pektintype med glatte og hårete områder, med arabinogalaktaner blant annet på "hairy regions". Rhamnose i prøvene sammen med galakturonsyre kan tyde på områder med rhamnogalakturonan i pektinmolekylene.

Galakturonsyre-inneholdet er høyt i alle fraksjonene etter gradienteluering på ionebytterkolonne, unntatt i 50GradFI og EtOHGrad. Dette skyldes at mesteparten av de sure polysakkaridene eluers ut med NaCl-gradienten. Ved eluering med 2 M NaCl får man også ut sure grupper, ofte har man høyere uronsyrenivå ved eluering med 2 M NaCl enn ved gradienteluering. For 100Salt kan man observere at mengden glukuronsyre er høyest av alle fraksjonene, mens det er lite av galakturonsyre. Det er mulig at det meste av galakturonsyren ble allerede eluert med gradienteluering, selv om det ikke ble påvist. Fraksjonene etter gelfiltrering, stammer fra 100GradFI og 100GradFII, har relativt høye nivåer av denne sistnevnte uronsyren.

Som nevnt under avsnitt 6.1.1 kan arabinogalaktaner frigjøres fra proteiner ved ekstraksjon av 50 % etanol. Dette bekreftes av monosakkaridanalyse utført på EtOHGrad og EtOHNøyt. Den sistnevnte fraksjonen har mest galaktose av alle prøvene, og nest høyest innhold av arabinose. I EtOHGrad er mengdene av disse to monosakkaridene betydelig mindre enn EtOHNøyt. Siden de nøytrale polysakkaridene elueres først på ionebytterkolonne, er det mest av disse to monosakkaridene i EtOHNøyt. Som forventet ser man lite av uronsyrene i de nøytrale fraksjonene.

	100GradFla	100GradFib	100GradFIIa	100GradFIIb	100GradFIIc	100Salt	100Nøyt	50GradFI	50GradFII	50GradFIII	EtOHGrad	EtOHNøyt
Arabinose	17,6	9,8	11,5	14,3	8,4	36,7	22,9	10,7	14	10,7	6,2	32,4
Rhamnose	7,1	4,5	5,2	4,9	3,5	3,5	1,9	1,6	6,8	6,5	0	3,3
Fukose	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0,0	0	0
Xylose	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0,0	0	0
Mannose	8,6	5,1	7,0	7,9	5,3	7,5	17,3	22,5	5,4	4,7	0	16,3
Galactose	18,7	11,6	12,7	13,7	9,8	24,1	18,3	18,2	15	13,6	6,3	25,2
Glucose	2,4	3	3,1	2,6	4,2	4,8	28,8	31,7	10,3	11,9	79,2	20,5
Glucuronic acid	13,3	9,1	12,1	12,3	7,5	21	7,5	5,4	11,6	10,2	0	0
Galacturonic acid	32,3	56,9	48,3	44,3	61,1	2,4	3,3	10,0	36,9	42,4	8,4	1,1
4-O-Me-GlcA	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0,0	0	0
Totalt mengde (%) i forhold til innveid materiale:	95,1	113,8	81,4	74,7	68,6	163,5	91	50,7	79,6	88,9	52,7	125,9

Tabell 6.3 Monosakkardsammensetningen til fraksjoner analysert på GC. Topp 1 til glukuronsyren er tatt med.

6.2.2 Bindingsforhold

Alle fem fraksjonene etter gelfiltrering med Sephacryl S-200 ble, etter karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon og acetylering, analysert på GC-MS med hensyn på bindingsforhold. Disse fem fraksjonene viste god aktivitet på komplementtesten, se figur 6.15, det ble derfor bestemt å gå videre med disse. Ved å finne informasjon om bindinger som knytter monosakkaridene sammen, kan man finne viktige strukturelementer i polysakkaridene. I tabell 6.4 kan man se monosakkaridenes bindingstype og deres mengde.

De bearbejdette monosakkaridene ble identifisert ved hjelp av retensjonstid og massespekter. Mengden av hver bindingstype i et monosakkarid er beregnet fra AUC til toppen i kromatogrammet tilhørende den bindingstypen i forhold til summen av AUC til alle toppene til det bestemte monosakkaridet. Dette forholdet ses i sammenheng med mengde monosakkarid (fra metanolyse, se tabell 6.3). Usikkerheten i resultatene fra metanolysen påvirker dermed utregning av bindingsforhold. Bindingstyper betegnet som spor utgjør mindre enn 1 % av den totale mengden monosakkarid.

Det er noen utfordringer knyttet til tolkning av MS-spektra. Forurensninger kan forekomme i GC-kromatogram, og toppene til monosakkarider kan dukke opp under forureningsstoppene og dermed vanskelig å identifisere. Overlapp, flere enn en bindingstype kommer under samme topp, fører til at noen bindingstyper ikke blir detektert. Videre kan det nevnes at det finnes forbindelser som har samme retensjonstid ved analyse på GC-MS. Dette gjelder galaktose og galakturonsyre. AUC til disse to beregnes ved å finne forholdet mellom intensitetene til fraksjonene på 233 m/z og 235 m/z. Glukose og glukuronsyre kommer også under samme topp på GC-kromatogram, og disse skilles ved å bruke forholdet mellom fraksjonene 205 m/z og 207 m/z.

Monosakarider og deres bindingsforhold		100GradFIa	100GradFIb	100GradFIla	100GradFIlb	100GradFIlc
Ara	Terminal _f	9,2 %	5,1 %	8,5 %	9,0 %	5,9 %
	1→3 _f	5,9 %	2,7 %	2,0 %	3,9 %	2,5 %
	1→5 _f	n.d.	1,6 %	1,0 %	1,4 %	n.d.
	1→3,5 _f	1,3 %	Spor	n.d.	n.d.	n.d.
	1→2,5 _f	<u>1,2 %</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>
	Totalt	17,6 %	9,8 %	11,5 %	14,3 %	8,4 %
Rha	Terminal	6,1 %	2,3 %	4,5 %	3,6 %	2,1 %
	1→2	n.d.	Spor	n.d.	1,1 %	spor
	1→2,4	<u>1,0 %</u>	<u>1,7 %</u>	<u>spor</u>	<u>spor</u>	<u>1,1 %</u>
	Totalt	7,1 %	4,0 %	4,5 %	4,7 %	3,2 %
Gal	Terminal	3,1 %	2,8 %	6,3 %	2,5 %	3,3 %
	1→4	2,3 %	Spor	n.d.	n.d.	spor
	1→3	3,8 %	2,5 %	2,6 %	3,6 %	1,6 %
	1→6	2,6 %	1,3 %	Spor	spor	1,5 %
	1→3,6	4,3 %	2,2 %	1,8 %	3,0 %	1,0 %
	1→3,4	n.d.	Spor	n.d.	n.d.	n.d.
	1→3,4,6	<u>2,6 %</u>	<u>1,5 %</u>	<u>2,0 %</u>	<u>4,0 %</u>	<u>2,4 %</u>
	Totalt	18,7 %	10,3 %	12,7 %	13,1 %	9,8 %
Gala	Terminal	spor	n.d.	3,0 %	Spor	spor
	1→4	20,4 %	56,9 %	45,3 %	44,3 %	61,1 %
	1→3,4	<u>11,9 %</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>
	Totalt	32,3 %	56,9 %	48,3 %	44,3 %	61,1 %
Glc	Terminal	spor	3,9 %	1,2 %	spor	1,1 %
	1→2	n.d.	1,5 %	n.d.	n.d.	n.d.
	1→4	<u>1,5 %</u>	<u>3,7 %</u>	<u>1,9 %</u>	<u>2,2 %</u>	<u>3,1 %</u>
	Totalt	1,5 %	9,1 %	3,1 %	2,2 %	4,2 %
GlcA	Terminal	n.d.	n.d.	n.d.	spor	n.d.
	1→2	13,3 %	9,1 %	2,6 %	6,7 %	5,1 %
	1→4	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>	<u>9,5 %</u>	<u>5,6 %</u>	<u>2,4 %</u>
	Totalt	13,3 %	9,1 %	12,1 %	12,3 %	7,5 %

Tabell 6.4 Bindingsforhold til de fem fraksjonene etter gelfiltrering, AUC-tallene er beregnet til prosent av total monosakkaridmengde fra metanolyse. Mannose ble bare detektert i en prøve, Ib, og mengden var 5,1 % 1→2 mannose

Homogalakturonan

Alle fraksjonene inneholder store mengder 1→4 bundet galakturonsyre, fra 20,4 % til 61,1 %. Dette tyder på at pektinet i planten inneholder betydelige mengder "glatte områder". Et annet moment som kan nevnes er at det ble identifisert en del 1,3,4 galakturonsyre i 100GradFIa, noe som kan tyde på at det finnes noen områder i "smooth region" som er forgrenet på C3.

Arabinaner

Arabinaner består 1→5-arabinose med forgreninger på C2 eller C3. I naturen er arabinaner koblet til enheter av galaktose. 1→3,5 arabinose er funnet bare i 100GradFIa og i spormengder i 100GradFIb, og 1→2,5 finnes bare i 100GradFIa. Små mengder av 1→5-arabinose er registrert i 100GradFIb, 100GradFIIa og 100GradFIIb. Dette tyder på at det finnes noe arabinan i alle fraksjoner unntatt 100GradFIc (i denne fraksjonen kan arabinan være tilkoblet galaktaner).

Arabinogalaktan type I

Arabinogalaktan type I består av β-1,4 bundet galaktan ryggrad med sidekjeder av arabinaner på C3, og noe på C5, på galaktose enhetene. Arabinaner nevnt over kan inngå i AG-I. 1→4 bundet galaktose er funnet i små mengder i 100GradFIa og i spormengder i 100GradFIb og 100GradFIc. Mens 1→3,4,6 bundet galaktose er detektert i alle fraksjonene. Dette kan være galaktose i hovedkjeden med forgreninger på C3 og C6. I tillegg er det spor av 1→3,4 galaktose i 100GradFIb, som kan være hovedkjeden med forgrening på C3. Dette kan tyde på AG-1 finnes til en viss grad i alle fraksjonene.

Arabinogalaktan type II

Arabinogalaktan type II sin indre og ytre kjede er bundet sammen med henholdsvis 1→3- og 1→6-galaktose. Forgreningene kan bestå av 1→3,6 galaktose og/eller 1→3-bundet arabinose kjeder. I alle fem fraksjonene ble det funnet følgende bindingstyper av galaktose; 1→3, 1→6 og 1→3,6. I tillegg til dette ble det registrert terminal-arabinose, og 1→3-bundet arabinose i disse fraksjonene. Dette indikerer at alle fem prøvene inneholder arabinogalaktan type II.

Rhamnogalakturonan type I

Denne typen av rhamnogalakturonan består av alternerende 1→2 rhamnose og 1→4 galakturonsyre, med forgreninger på C3 og C4 på rhamnose. I RG-I kan man også detektere 1→4 glukuronsyre. Fraksjonene har i veldig liten grad 1→2 rhamnose (100GradFIa inneholder ikke denne bindingstypen), og 1→2,4 rhamnose er 1 % av rhamnoseinnholdet i 100GradFIa og i spormengder i 100GradFIb, 100GradFIIf og 100GradFIIfc. I tillegg kan man observere 1→4 glukuronsyre i alle tre fraksjonene derivert fra 100GradFII. Da alle fem fraksjonene har store mengder 1→4 galakturonsyre, men små mengder rhamnose er det en mulighet for at de analyserte fraksjonene inneholder få områder med rhamnogalakturonan type I. Siden det er lite av 1→2,4 bundet rhamnose kan dette indikere at det er få forgreningspunkter i de hårete områdene.

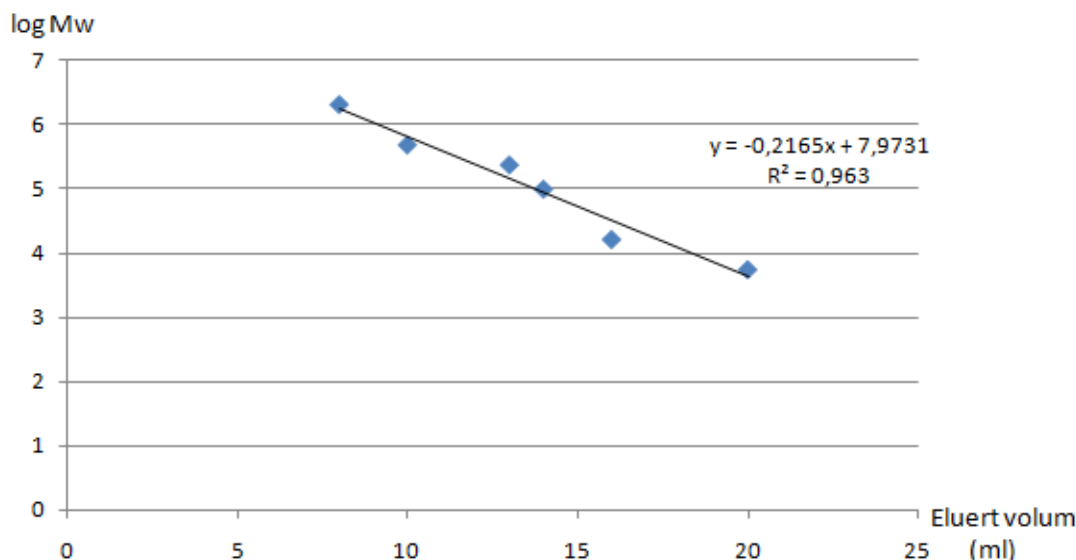
Rhamnogalakturonan type II

Rhamnogalakturonan type II består av en hovedkjede med 9-10 α -1→4 galakturonsyreenheter med forgreninger på posisjon 3 eller 4. I forgreningspunktene kan det være terminal arabinose, rhamnose og 1→2 rhamnose. Sidekjedene inneholder blant annet fukose og mannose. RG-II inneholder i tillegg 1→2 glukuronsyre. Bare 100GradFIa inneholder en del 1→3,4 galakturonsyre. Ingen av prøvene inneholdt fukose. I motsetning til resultatene fra metanolysen (se tabell 6.3) ble mannose, 1→2 bundet, detektert i bare 100GradFIb. Mens tabell 6.3 viser 5-16 % mannose i alle fraksjonene unntatt EtOHGrad. Denne uoverensstemmelsen skyldes at mannose detekteres dårlig på GC-MS. Terminal arabinose, rhamnose er en del i alle fraksjonene, mens 1→2 rhamnose er funnet i liten grad i alle prøvene unntatt 100GradFIa. 1→2 glukuronsyre er funnet en del i alle fem fraksjonene. Dette tyder på at alle fem fraksjonene inneholder i ulik grad områder med rhamnogalakturonan type II.

Et annet strukturelement som kan ses fra tabell 6.4 er at alle fraksjonene inneholder store mengder terminale sukkere, noe som tyder på det er mye forgrening i pektinmolekylene.

6.2.3 Molekylvektsdistribusjon

Molekylvektsdistribusjonen til de fem fraksjonene etter gelfiltrering ble bestemt på FPLC, også kalt HPSEC (High Performance Size-exclusion Chromatography). Polymerkjedene separeres etter deres hydrodynamiske volum ved at store molekyler ekskluderes ut. Slik at retensjonsvolum av en fraksjon gir et mål på molekylstørrelse. Kromatogrammet som kommer ut representerer en molekylvektsdistribusjon, men FPLC gir ikke absolutt molekylvekt. Molekylvektsdistribusjon er baseres på at systemet kalibreres med en rekke standarder. Det brukes dekstranstandarder med kjent molekylvekt slik at retensjonsvolum kan konverteres til molekylvekt (Wang og Cui 2005). Dekstranstandardene som ble brukt hadde følgende Mw: 5 600 Da, 16 400 Da, 98 400 Da, 233 000 Da, 475 000 Da og 2 000 000 Da. Disse ble applisert på FPLC på forhånd, og absorbansmaksimum og tilhørende retensjonsvolum ble oppgitt. Verdiene fra standardene ble brukt til å lage en linær semilogaritmisk kurve, se figur 6.6. Korrelasjonen på 0.963 er høy, dette betyr at det er en god sammenheng mellom eluert volum, ved maksimumabsorbans ved 487 nm, og logaritmen til dekstranenes Mw. Regresjonslinjen, sammen med data fra FS-testen utført på eluatet fra HPSEC-kolonnen, brukes for å beregne molekylvektsdistribusjon (se tabell 6.5).



Figur 6.6 Standardkurve for dekstraner med kjent molekylvekt. Eluert volum ved toppmaksimum med logaritmen til dekstranenes Mw.

En annen faktor som bør overveies ved HPSEC er ionestyrken. Det er velkjent at når ionestyrken til elueringsbufferen er under 0,1 så øker størrelsen til aggregater. Selv ved ionestyrke på 0,1 eller mer kan pektiner klumpe seg sammen til lange staver, og dermed

elueres ut mye tidligere på SEC-kolonnen enn dekstraner med ekvivalent Mw og gi feilaktige høye resultater. En mulig teori er at de negativt ladete D-Galakturonsyrene ekskluderes fra porene i kolonnematerialet av et lite antall negativt ladde forbindelser som er fastbundet i gelmaterialet. Denne elektrostatiske frastøtningen mellom ionegruppene påvirker hydrodynamisk volum og dermed både viskositeten og elueringvolumet til polysakkaridene på SEC-kolonne. Med tanke på dette ble det testet med 0,3 M Na-acetat buffer som (for å undertrykke intramolekylær ionisk frastøtning) og imidazol (solubiliseringssagens for pektiner) (Mort og Moerschbacher 1991).

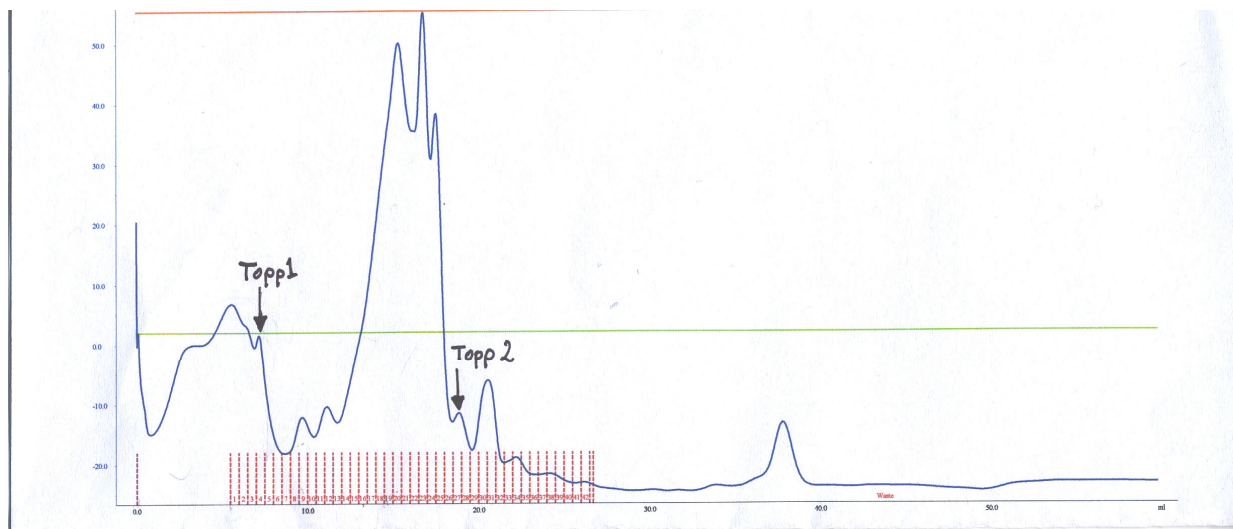
Molekylvektsdistribusjonen til alle frem fraksjonene etter gelfiltrering skulle bestemmes på FPLC. Da det var større mengder av 100GradFIa og 100GradFIb enn resten av fraksjonene (se tabell 6.2), ble disse to i tillegg til 10 mM NaCl ble eluert med 0,3 M natriumacetat. Ved eluering med natriumklorid ble det benyttet 4 mg prøvemateriale, mens ved natriumacetat-eluering ble det brukt halvparten så mye.

Når det gjelder Mw er polysakkarider polydisperse, det vil si de har kjeder av ulik antall monosakkarider. Denne variasjonen gir opphav til molekylvektsdistribusjon. Derfor vil man forvente flere topper etter eluering på FPLC. Figur 6.7 viser kromatogram fra HPSEC hvor 100GradFIb er applisert på Superose-6, og UV-detektor er benyttet. Dette kromatogrammet viser mange topper for det er mange stoffer som gir UV-absorbans for eks. lavmolekylære forbindelser. Fra disse toppene alene er det vanskelig å tolke hvilke topper som tilhører polysakkarider. Derfor ble det utført FS-test på eluatet etter separasjon på FPLC. Figur 6.8 og figur 6.9 viser 100GradFIb eluert henholdsvis med NaCl og natriumacetat.

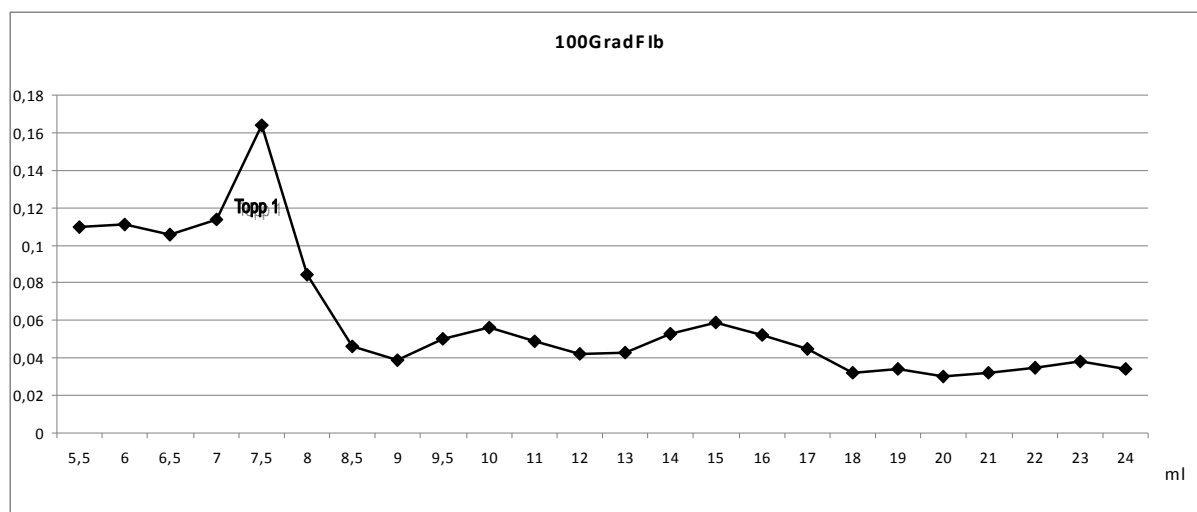
Som figur 6.9 viser er absorbansen mye lavere ved eluering med natriumacetat enn ved eluering med natriumklorid. Dette skyldes stoffmengdene applisert på kolonnen. De lave absorbanstallene er så lave at de har en usikkerhet i seg selv, små endringer i absorbans virker mye større på elueringsprofil enn det som er reelt. Av figur 6.9 kan man observere at polysakkaridene blir bedre separert med natriumacetat, i tillegg til at lavmolekylære forbindelser blir separert (Topp 2). Topp 1 kommer noe tidligere ved bruk av natriumacetat, dette resulterer i høyere Mw for polysakkaridene (se tabell 6.5). For 100GradFIa fås en topp ved eluering med begge løsningsmidler, og også her blir molekylvektsdistribusjonen større ved bruk av natriumacetat. Disse resultatene er helt motsatte av hypotesen om at høyere ionestyrke vil gi mindre aggregater, og dermed mindre Mw. Det kan hende at ionestyrken

ikke var tilstrekkelig høy til at det hindret aggregering i polysakkaridene i planten som studeres. Det ble funnet ut at pektinene i plantematerialet hadde mye forgrening. Kombinasjon av høy molekylvekt og forgrening kan gi opphav til høy aggregeringsgrad. Et annet moment som bør nevnes er at det kan ha oppstått interferens mellom prøvene og kolonnematerialet. I så fall ville dette gi problemer med å bestemme molekylvekt og gi feil resultater. Man kan trekke den slutningen at det er en metodefeil, og at Superose-6 ikke egner seg for molekylvektbestemmelse.

Fra tabell 6.5 ser man at molekylvekt til de ulike fraksjonene strekkes seg fra 2,7 til 4 721 kDa. Dekstranstandardene som ble tatt i bruk hadde molekylvekt fra 5,6 til 2 000 kDa. Da molekylvekten til standardene er mye lavere enn estimert M_w , er det en viss usikkerhet i resultatene. Dessuten ble de fem fraksjonene i tabell 6.5 separert godt på Sephacryl S-200 (avsnitt 6.1.3), som hadde separasjonsområde mellom 1-80 kDa. Resultatene fra FPLC har gitt feil resultater, og kan ikke brukes videre.



Figur 6.7 Kromtaogram basert på UV-deteksjon ved applisering av 100GradFib på Superose-6 på FPLC. Topp 1 kommer ved ca. 7 ml, mens topp kan man observere ved 18 ml. Det er eluert volum (ml) på x-aksen og absorbans på y-aksen.



Figur 6.8 Karbohydratprofil etter eluering av 100GradFib med 10 mM NaCl på Superose 6-kolonne.



Figur 6.9 Karbohydratprofil etter eluering av 100GradFib med natriumacetat på Superose-6.

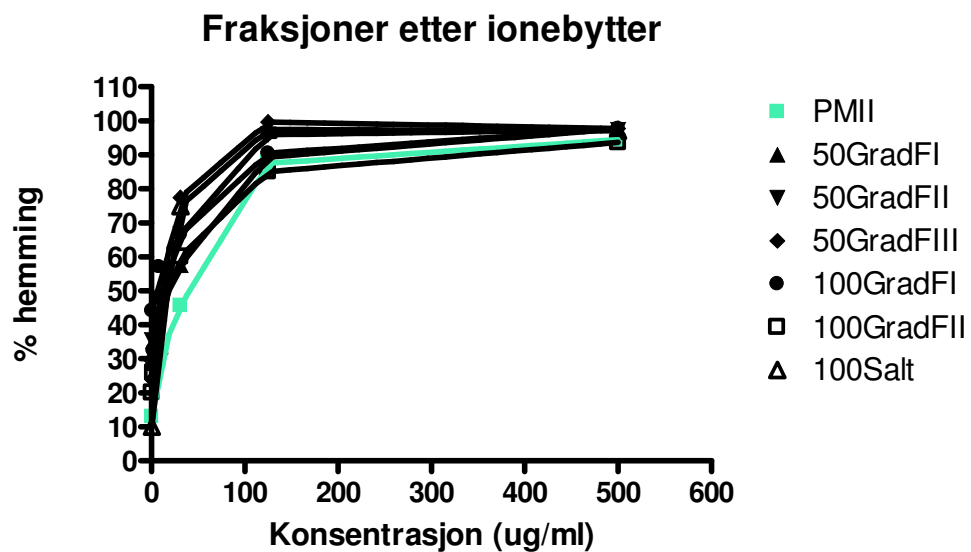
Fraksjon	Fra Mw (Da)	Til Mw (Da)	1. topp Mw (Da)	2.topp Mw (Da)
100GradFIa	824 802	390 481	642 835	
100GradFIa-acetat	4 273 660	1 058 278	2 235 372	
100GradFIb	3 501 063	1 169 230	2 595 971	
100GradFIb-acetat	3 680 018	2670	2 868 137	7237
100GradFIIa	4 721 717	144 078	2 349 632	
100GradFIIb	4 492 106	824 802	2 728 663	
100GradFIIc	3 868 120	1 006 815	3 014 740	

Tabell 6.5 Estimert molekylvektsdistribusjon.

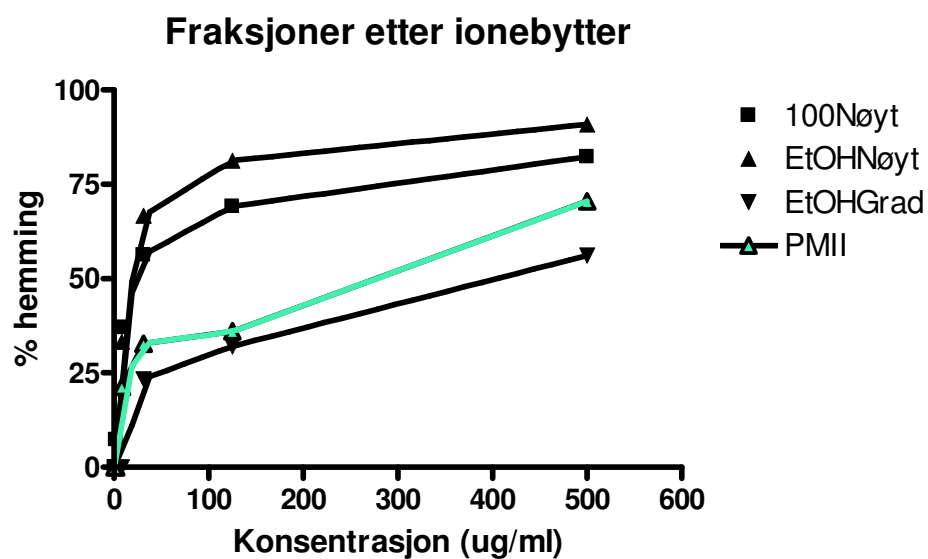
6.3 Biologisk aktivitet

6.3.1 Komplementfikseringstest

Denne testen måler antikomplementær aktivitet, det vil si prosent hemming av hemolyse. Evnen til å modulere komplement kan indikere effekt i immunsystemet. Ulike fraksjoner etter ionebytterkromatografi og gelfiltrering ble derfor testet for komplementfikserende aktivitet. Standarden, PMII, brukes fordi denne biologiske testen utviser stor variasjon. ICH_{50} -verdi, den laveste konsentrasjonen av prøve som gir 50 % hemming av komplement, brukes som parameter for å sammenligne den komplementfikserende aktiviteten.



Figur 6.10 Komplementfikserende aktivitet til ulike fraksjoner etter ionebytterkromatografi.

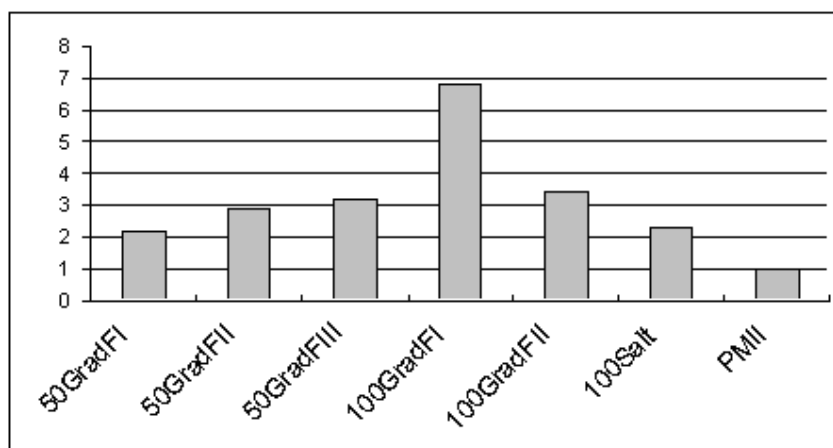


Figur 6.11 Komplementfikserende aktivitet til ulike fraksjoner etter ionebytterkromatografi.

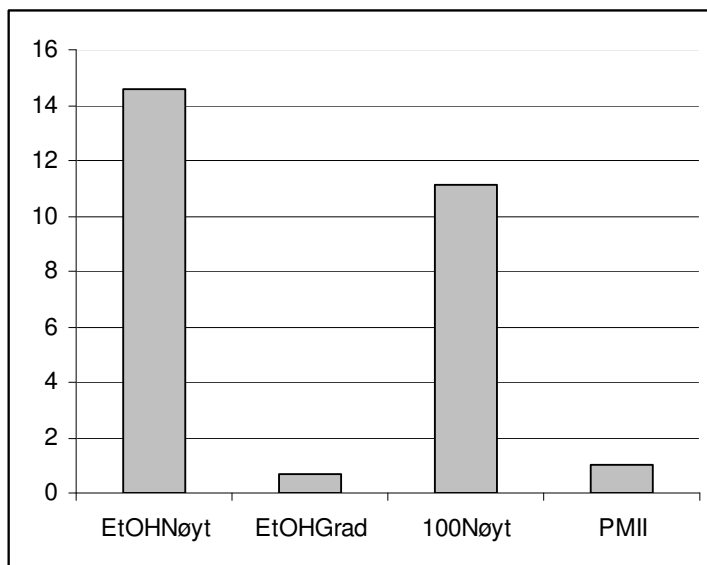
Fraksjon	ICH ₅₀ -verdi	Fraksjon	ICH ₅₀ -verdi
50GradFI	19	EtOHNøyt	19
50GradFII	14	EtOHGrad	404
50GradFIII	13	100Nøyt	25
100GradFI	6	PMII	277
100GradFII	12		
100Salt	18		
PMII	41		

Tabell 6.6 ICH₅₀-verdier tilhørende fraksjoner på figur 6.10 og 6.11

Figur 6.10 og 6.11 med tabell 6.6 viser komplementfikserende aktivitet til ulike fraksjoner etter rensing på ionebytterkolonne. Fra figur 6.13 ser man at EtOHGrad ikke er aktiv, mens 100Nøyt og EtOHNøyt er i høy grad aktive i forhold til PMII. EtOHGrad var lyse brun, mens EtOHNøyt var brun. Fargen på prøvematerialet kan indikere at det er noen fargestoffer som gir aktivitet på komplementfikseringstesten. Men dette er ikke tilfelle når man sammenligner de andre fraksjonenes farge og aktivitet. I figur 6.12 og 6.13 er ICH₅₀-verdiene regnet ut relativt til PMII for lettere å kunne sammenligne aktivitet. Alle fraksjonene i figur 6.12 har høyere aktivitet enn standard. 100 °C vannekstrakter etter gradienteluering på ionebytterkolonne utviser høyere biologisk aktivitet enn tilsvarende fraksjoner fra 50 °C. Noen biologisk aktive substanser blir sannsynligvis ekstrahert ut ved 100 °C. 100GradFI og 100GradFII er de mest aktive, og ble derfor valgt til videre studier.

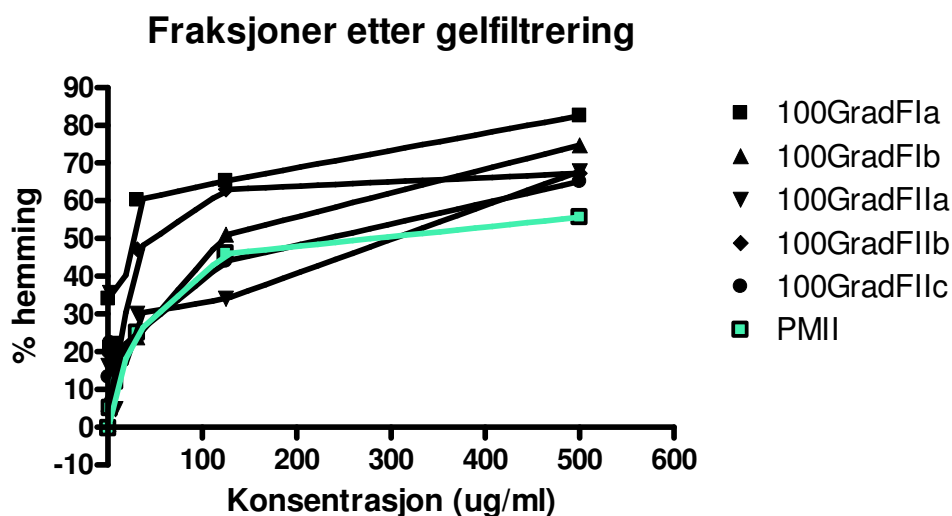


Figur 6.12 ICH₅₀-verdier relativt til PMII.



Figur 6.13 ICH₅₀-verdier relativt til PMII.

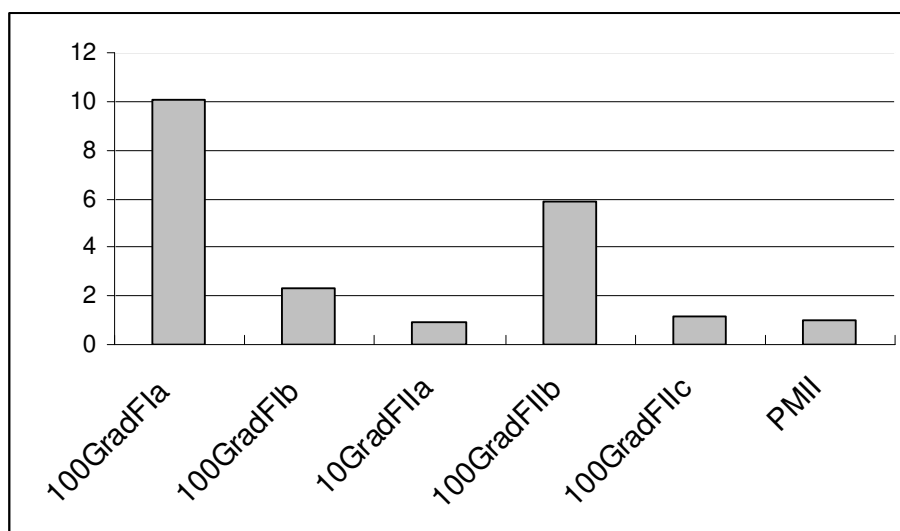
Forsøket med EtOH-fraksjonene og 100Nøyt ga veldig høy ICH₅₀-verdi i forhold til andre forsøk. Dette fører til de utregnede resultatene, basert på denne verdien, har stor usikkerhet. I tillegg ble det utført bare et forsøk på fraksjonene i figur 6.11. For at resultatene skal være sikre må testen utføres minst to ganger.



Figur 6.14 Komplementfikseringstest på fraksjonene etter rensing på gelfiltreringskolonne.

Fraksjon	ICH ₅₀ -verdi
100GradFIa	28
100GradFIb	124
100GradFIIa	303
100GradFIIb	48
100GradFIIc	232
PMII	282

Tabell 6.7 ICH₅₀-verdier tilhørende figur 6.14.



Figur 6.15 ICH₅₀-verdier relativt til PMII.

Fraksjonene etter gelfiltrering ble testet for komplementfikserende aktivitet, se figur 6.14 og tabell 6.7. Ved å sammenligne figur 6.12 og 6.15 kan man se at aktiviteten er høyere etter gelfiltrering. Muligens kan dette skyldes at fraksjonene etter ionebytter inneholder forbindelser som påvirker/reducerer de komplementfikserende strukturene, og som blir fjernet under gelfiltrering. Det ser ut til at de lavmolekylære polysakkaridene (100GradFIb og 100GradFIIc) har nesten lik aktivitet som PMII, mens de høymolekylære polysakkaridene i 100GradFIa og 100GradFIIb er de mest aktive. Det er mulig at den høye bioaktiviteten observert for 100GradFIa og 100GradFIIb kan skyldes de høymolekylære polysakkaridene i prøven. 100GradFIIa er fraksjonen som er mest høymolekylær, men har lavest biologisk aktivitet i komplementtesten. Bindingsforhold (tabell 6.4) viste at 100GFIIa var den eneste fraksjonen som ikke inneholdt 1→2,4 rhamnose. Dette kan tyde på denne fraksjonen har

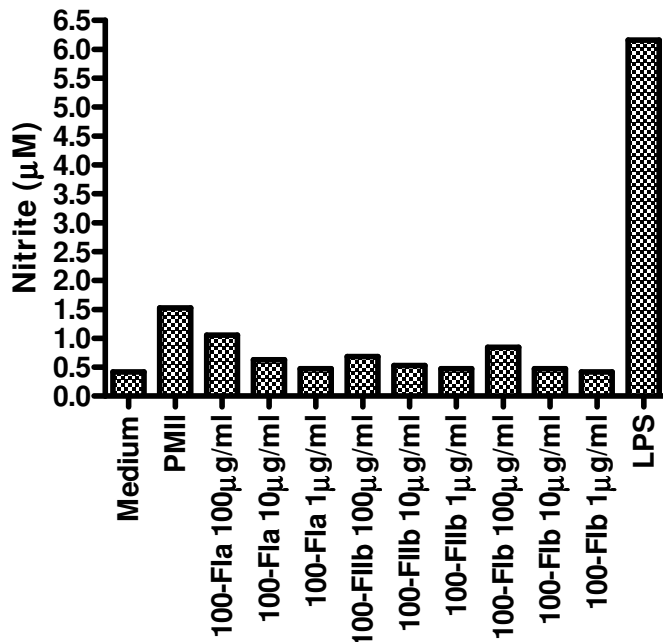
mindre hårete områder (som har antikomplementær aktivitet), og dermed har lavere aktivitet på komplementfikseringstesten. 100GradFIa viser høyest aktivitet på figur 6.15, dette kan muligens skyldes at denne fraksjonen er den eneste som inneholder en del 1→3,4 galakturonsyre. Denne bindingstypen til galakturonsyren er en del av hovedkjeden til RG-II som har vist antikomplementær effekt. 100GradFIa har dessuten mest av 1→2 glukuronsyre som også finnes i RG-II. I tillegg har denne fraksjonen minst 1→4 og 1→3,4 bundet galakturonsyre, som er i homogalakturonan (nedregulerende effekt på bioaktiviteten). Tabell 6.4 viser at fraksjon 100GradFIb, 100GradFIa og 100GradFIc har mest 1→4 galakturonsyre, og disse tre prøvene har lavest aktivitet på figur 6.15.

Tabell 6.7 viser høy ICH_{50} -verdi for PMII, dette gir usikkerhet i resultatene. I tillegg ble forsøk med fraksjoner i figur 6.14 bare utført en gang. De tre mest aktive fraksjonene, 100GradFIa, 100GradFIb og 100GradFIb, ble brukt til videre analyser.

6.3.2 NO-frigjøring fra makrofager

Makrofager fungerer som fagocytter, og produserer blant annet nitrogenoksid (NO), vekstfaktorer og cytokiner ved aktivering. Det ble målt NO-frigjøring fra makrofager etter stimulering av makrofagene med 100GradFIa, 100GradFIb og 100GradFIb. Disse tre fraksjonene ble valgt grunnet sin høye aktivitet i komplementfikseringstesten (figur 6.15). Grunnet problemer med cellelinjen, ble det bare utført en parallell av prøvene. Det trengs minst to paralleller i dette forsøket for at resultatene skal være pålitelige, data fra denne testen har dermed stor usikkerhet. Resultatene brukes likevel som en indikasjon på biologisk aktivitet.

Som figur 6.16 viser har alle tre fraksjoner lav aktivitet sammenlignet med de positive kontrollene lipopolysakkarid (LPS) og PMII. Prøven som ser ut til å inneha den høyeste aktiviteten er 100GradFIa i konsentrasjon på 100 µg/ml. Denne fraksjonen utviser også høyest aktivitet i komplementtesten. 100GradFIb har noe større aktivitet enn 100GradFIb, men begge har relativt lav aktivitet i forhold til PMII, men har større aktivitet enn negativ kontroll. Mens figur 6.15 viser at begge de sistnevnte fraksjonene har høy aktivitet relativt til PMII, med 100GradFIb som den mest aktive av dem begge. Dette tyder på at biologisk aktivitet utvist i en immunologisk test ikke alltid gir samsvar med bioaktivitet i en annen test.



Figur 6. 16 Måling av NO-frigjøring fra makrofager etter stimulering med 100GradFla, 100GradFIb og 100GradFIIb. LPS og PMII fra bladene av *Plantago major* L. ble benyttet som positive kontroller.

6.4 Strukturoppklaring etter enzymatisk degradering

6.4.1 Gelfiltrering med PD-10 kolonne

Det ble valgt å bruke tre prøver, 100GradFla, 100GradFIb og 100GradFIIb, til enzymdegradering på bakgrunn av immunmodulerende aktivitet (figur 6.15) og mengde prøvematerialet (tabell 6.2) tilgjengelig.

Fraksjon	Mengde inkubert	Utbytte	Utbytte
100GradFla	10 mg	6,3 mg	63 %
100GradFIb	10 mg	1 mg	10 %
100GradFIIb	5 mg	3,2 mg	64 %

Tabell 6.8 Fraksjoner valgt til enzymdegradering. Prosent utbytte er regnet fra prøvemengde inkubert. En del av 100GradFIIb ble gitt til en annen forskningsgruppe, derfor kunne det bare brukes 5 mg av denne fraksjonen til enzymdegradering.

Da utbyttet fra 100GradFIb (se tabell 6.8) ble veldig lite, kunne denne fraksjonen bare brukes videre på komplementfikseringstesten. Tapet av denne fraksjonen kan ha funnet sted under denaturering av enzymet (se metode 5.4.2).

6.4.2 Monosakkaridanalyse

Etter enzymatisk degradering ble monosakkaridsammensetningen til 100GradFIa og 100Grad FIb analysert på GC etter metanalyse (metode 5.3.2). Resultatene viste ingen markant endring i monosakkaridene totalt sett. Det ble bestemt å sette galaktose som 1, siden den var uendret etter enzymdegradering, og beregne relative mengder monosakkarid (se tabell 6.9). Trolig er galaktose bundet innerst i polysakkaridene og ikke var påvirket av degraderingsprosessen. Som forventet er mengden arabinose redusert i begge fraksjonene, men ikke betraktelig etter enzymdegradering. Dette kan skyldes at enzymet, arabinofuranosidase, var i underskudd eller ikke har virket tilstrekkelig. Unntatt uronsyrene har ikke innholdet av de andre monosakkaridene endret seg merkverdig.

	100GradFIa			100GradFIb	
	Orig	Enz		Orig	Enz
Arabinose	0,94	0,72	Arabinose	0,86	0,76
Rhamnose	0,38	0,46	Rhamnose	0,36	0,37
Fukose	0	0	Fukose	0	0
Xylose	0	0	Xylose	0	0
Mannose	0,46	0,59	Mannose	0,54	0,66
Galaktose	1	1	Galaktose	1	1
Glukose	0,13	0,06	Glukose	0,43	0,12
Glukuronsyre	0,71	0,89	Glukuronsyre	0,77	1,0
Galakturonsyre	1,73	1,0	Galakturonsyre	6,2	2,1
4-O-Me-glukuronsyre	0	0	4-O-Me-glukuronsyre	0	0
Total mengde sukker	5,1	4,4	Total mengde sukker	7	4,3

Tabell 6.9 Monosakkaridsammensetning før (orig) og etter (enz) enzymatisk degradering, reeltivt til galaktose.

I pH-området 1-4 blir sure polysakkarider, som da er ladete, hydrolysert raskere enn nøytrale polysakkarider. Det er vist at degradering av uronsyrer er pH-avhengig. Årsaken til økt hydrolyse av ladete sure sukkere kan være at når pH er middels høy, er protonkonsentrasjonen nær kjeden mye høyere enn i resten av løsningen. (Smidsrød et al 1966). Dette kan forklare grunnen til GalA i begge prøvene blir redusert etter enzymdegradering. I 100GradFIa blir denne uronsyren nesten halvert, mens i 100GradFIib blir den redusert til en tredjedel. Glukuronsyren i begge fraksjonene øker noe etter enzymdegradering, men denne økningen er ikke signifikant. Det er mulig at glukuronsyren i begge prøvene sitter innerst og/eller forgrenet i pektinet, og dermed ikke blir påvirket av pH. Mens GalA kan være bundet ytterst i pektinmolekylene og mer utsatt for syrehydrolyse. Den totale mengden sukker blir redusert noe etter enzymatisk degradering, dette er som følge av reduksjon i arabinose og galakturonsyre i begge fraksjonene etter ezymdegradering.

6.4.3 Bindingsforhold

Monosakarider og deres bindingsforhold		100GradFIa	100GradFIaz	100GradFIHb	100GradFIHbz
Ara	Terminal _f	9,2 %	9,2 %	9,0 %	8,7 %
	1→3 _f	5,9 %	5,6 %	3,9 %	2,9 %
	1→5 _f	n.d.	n.d.	1,4 %	spor
	1→3,5 _f	1,3 %	n.d.	n.d.	spor
	1→2,5 _f	<u>1,2 %</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>
	Totalt	17,6 %	14,8 %	14,3 %	11,6 %
Rha	Terminal	6,1 %	2,5 %	3,6 %	4,3 %
	1→2	n.d.	6,3 %	1,1 %	1,3 %
	1→2,4	<u>1,0 %</u>	<u>spor</u>	<u>spor</u>	<u>spor</u>
	Totalt	7,1 %	8,8 %	4,7 %	5,6 %
Gal	Terminal	3,1 %	5,7 %	2,5 %	3,7 %
	1→4	2,3 %	n.d.	n.d.	n.d.
	1→3	3,8 %	7,1 %	3,6 %	3,8 %
	1→6	2,6 %	spor	spor	spor
	1→3,6	4,3 %	spor	3,0 %	3,7 %
	1→3,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	1→3,4,6	<u>2,6 %</u>	<u>6,6 %</u>	<u>4,0 %</u>	<u>4,7 %</u>
	Totalt	18,7 %	19,4 %	13,1 %	15,9 %
GaA	Terminal	spor	n.d.	spor	1,7 %
	1→4	20,4 %	21,0 %	44,3 %	32 %
	1→3,4	<u>11,9 %</u>	<u>n.d.</u>	<u>n.d.</u>	<u>spor</u>
	Totalt	32,3 %	21,0 %	44,3 %	33,7 %
Glc	Terminal	spor	n.d.	spor	spor
	1→2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	1→4	<u>1,5 %</u>	n.d.	<u>2,2 %</u>	<u>1,7 %</u>
	Totalt	1,5 %		2,2 %	1,7 %
GlcA	Terminal	n.d.	n.d.	spor	n.d.
	1→2	13,3 %	n.d.	6,7 %	7,2 %
	1→4	<u>n.d.</u>	n.d.	<u>5,6 %</u>	<u>9,4 %</u>
	Totalt	13,3 %		12,3 %	16,6 %

Tabell 6.10 Bindingsforhold til 100GradFIa og 100GradFIHb før og etter enzymatisk degradering. Tall tilhørende fraksjoner før enzymdegradering er hentet fra tabell 6.4.

100GradFIaz

Det ble ikke funnet hvilke bindingstyper til arabinose som arabinofuranosidase bryter. Siden 1→3,5 og 1→2,5 arabinose er tapt etter enzymatisk degradering, se tabell 6.10, har enzymet trolig spaltet av de forgrenete gruppene. Mengde arabinan er dermed blitt mindre etter enzymdegradering. Terminal rhamnose ble betydelig redusert samtidig som fraksjonen fikk 6,3 % 1→2 rhamnose mot null før degradering. Det er mulig at enzymet som ble benyttet var kontaminert med enzym som bryter ned T-rhamnose.

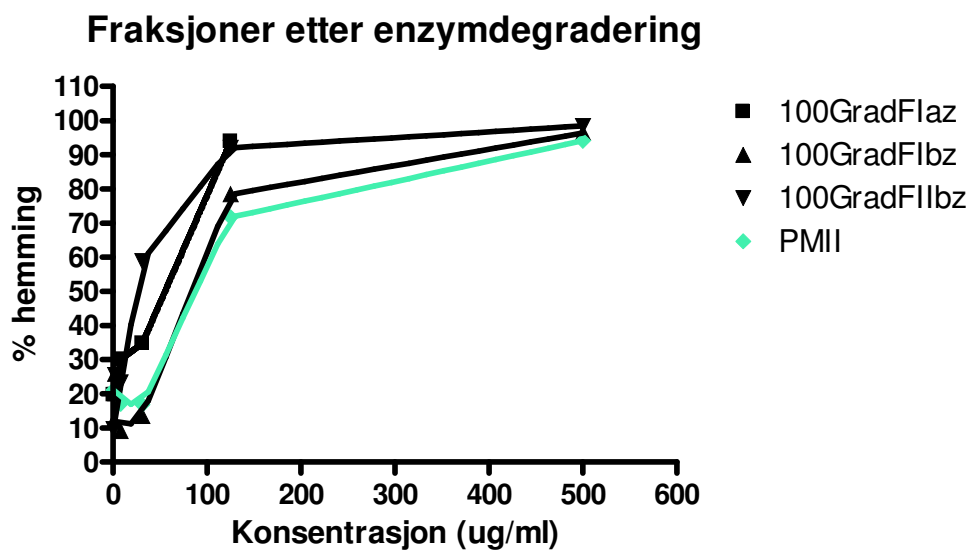
Når det gjelder galaktose, er 1→4, 1→6, 1→3,6, 1→3,4,6 og terminal, blitt mindre. Arabinogalaktan I og arabinogalaktan II er trolig redusert etter enzymdegradering. 1→3,4 galakturonsyre er blitt totalt fjernet etter degradering. Denne bindingstypen til galakturonsyre kan være hovedkjeden med forgrening på C3, og finnes både i homogalakturonan og RG-II. Det er lite endringer i de andre bindingene for å kunne bestemme noe sikkert. Nedgangen i galakturonsyren kan ha skjedd ved syrehydrolyse under enzymdegraderingen. Dette kan tyde på at syrehydrolyse beskrevet under avsnitt 6.4.2 kan ha hydrolysert 1→3,4 bindingstypen i galakturonsyre. Toppen til 1→2 glukuronsyre i 100GradFIaz ble funnet i MS-spekteret, men det var altfor lite stoff til å gjøre utregninger. Man antar at mengden av denne bindingstypen er muligens uendret i fraksjonen siden denne bindingstypen er relativt uendret i 100GradFIibz.

100GradFIibz

I denne fraksjonen ser man at 1→3 og 1→5 bundet arabinose er redusert. Enzymet som er brukt kan ha virket inn på disse to bindingstypene til arabinose. Mengden arabinan er redusert noe etter enzymdegradering, men det er vanskelig å vite om det er arabinan som inngår i arabinogalaktan eller ikke. Bindingsforholdene til rhamnose, galaktose, glukose og glukuronsyre er relativt uendret i forhold til den originale fraksjonen. Galakturonsyren, i likhet med 100GradFIaz, har blitt syrehydrolysert og man ser at en del av 1→4 galakturonsyre er blitt degradert. Trolig har andelen glatte områder blitt mindre etter enzymdegradering. Mannose er funnet i 100GradFIaz og 100GradFIibz, ved hjelp av metanolyse (tabell 6.9), men som nevnt tidligere detekteres ikke ved analyser på GC-MS.

6.4.4 Komplementfikseringstest

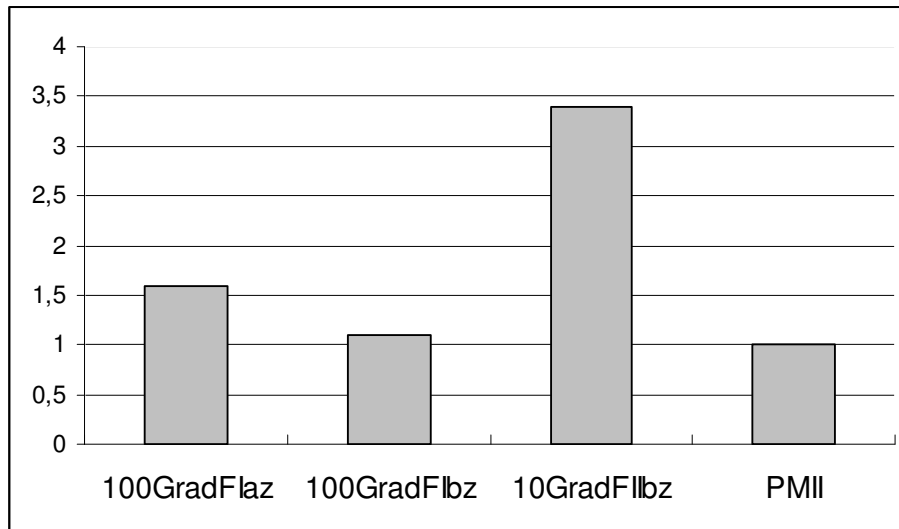
Etter enzymdegradering ble det utført komplementfikseringstest på 100GradFlaz, 100GradFlbz og 100GradFIlbz (se figur 6.17 og tabell 6.11).



Figur 6.17 Komplementfikserende aktivitet.

Fraksjon	ICH ₅₀ /verdi
100GradFlaz	55
100GradFlbz	84
100GradFIlbz	26
PMII	88

Tabell 6.11 ICH₅₀-verdier til figur 6.17.



Figur 6.18 ICH₅₀-verdier relativt til PMII.

Sammenlignet med figur 6.15 har alle tre fraksjonene etter enzymdegradering fått betydelig reduksjon i komplementfikserende aktivitet. 100GradFla har gått fra å være 10 ganger mer aktiv enn PMII til å være nesten like aktiv som PMII, se figur 6.18. 100GradFlb utviser, etter degraderingen, like god effekt som PMII. Mens aktiviteten til 100GradFlIb er redusert til halvparten etter enzymatisk degradering. Komplementfikseringstesten ble utført kun en gang på disse tre prøvene. Grunnet lite stoffmengde ble det bare utført komplementfikseringstest på 100GradFlbz. Derfor har man ikke kunnet funnet ut hvorfor bioaktiviteten til 100GradFlb er redusert etter enzymdegradering. Av alle disse tre fraksjonene har 100GradFlbz fått minst reduksjon i komplementfikserende aktivitet.

Etter enzymatisk degradering har AG-I og II områdene i 100GradFla blitt mindre. Man antar derfor at AG-I og/eller AG-II er hovedansvarlig for den biologiske aktiviteten til denne fraksjonen. 100GradFlIbz har fått noe mindre arabinan etter enzymdegradering mens andelen glatte områder er redusert. Studier har vist at homogalakturonan har nedregulerende effekt på bioaktiviteten. Mens i tilfellet med 100GradFlIb har man fått en reduksjon i glatte områder, samtidig som den komplementfikserende aktiviteten også er markant redusert. En hypotese er at arabinan i denne fraksjonen bidrar til den biologiske aktiviteten, og at reduksjonen i glatte områder ikke var tilstrekkelig stort til å ha noen innvirkning på biologisk aktivitet.

6.5 Videre studier

Analyser utført på *H. hemerocallidea* har vist at vann- og etanolekstraktet har biologisk aktive forbindelser. Grunnet lite stoff og tidsbegrensning ble det valgt å fokusere på noen få fraksjoner. Følgende punkter kunne

- 50GradFI, 50GradFII, 50GradFIII, 100Salt, EtOHNøyt og 100Nøyt viste høy aktivitet på komplementfikseringstesten. Det kunne vært interessant å rense disse videre på gelfiltreringskolonne, og utføre påfølgende struktur- og aktivitetsstudier på dem.
- Generelt sett burde komplementfikseringstesten og testen på makrofager utføres på nytt for at resultatene skal være sikre. Biologiske testsystemer utviser stor variasjon, og det bør utføres forsøk med flere paralleller.
- Molekylvektsdistribusjon bør bestemmes med en ny metode eller annet kolonnemateriale.
- Et annet enzym, som for eksempel polygalakturonase, kan benyttes for å hydrolysere andre deler av pektinet for å utforske mer om struktur- og aktivitetsforhold.

7. Konklusjon

Isolering

Polysakkaridene fra *Hypoxis hemerocallidea* ble ekstrahert ut med etanol og 50- 100 °C vann. Disse ekstraktene ble rensset på ionebytterkolonne, og dette resulterte i 12 fraksjoner. Av disse ble det valgt å gå videre med 100GradFI og 100GradFII. Etter gelfiltrering av de to sistnevnte prøvene fikk man fem fraksjoner, og 100GradFIa, 100GradFIb og 100GradFIIf ble utsatt for enzymatisk degradering.

Struktur- og aktivitetsforhold

Av fraksjonene etter ionebytter viste 100Nøyt, EtOHNøyt, 100GradFI og 100GradFII høyest aktivitet på komplementfikseringstesten. Alle de fem fraksjonene etter gelfiltrering viste høy aktivitet på komplementfikseringstesten. Av disse hadde 100GradFIa, 100GradFIb og 100GradFIIf høyest aktivitet. Mens testen på makrofager viste at disse tre prøvene hadde nokså lav biologisk effekt på makrofager. Etter enzymdegradering ble den komplementfikserende aktiviteten til disse tre fraksjonene dramatisk redusert, men 100GradFIb hadde lite reduksjon.

Alle fraksjonene som ble analysert for monosakkaridsammensetning, viste høyt nivå av monosakkarider deriblant arabinose, galaktose, rhamnose og galakturonsyre. Disse monosakkarider danner AG-I, AG-II, RG-I og homogalakturonan, områder som finnes i pektiner. Bindingsforhold og monosakkaridanalyse viste at alle fem fraksjonene etter gelfiltrering hadde noe arabinan og små mengder RG-I. De hårete områdene hadde få forgreningspunkter. Det ble funnet ulik grad av RG-II i disse fem prøvene. På bakgrunn av bindingsforhold antar man at alle fem prøvene inneholder AG-I og AG-II, og mengden av glatte områder er betydelig i alle fraksjonene analysert på GC-MS.

Under enzymdegradering ble galakturonsyren i prøvene utsatt for syrehydrolyse. Trolig sitter denne uronsyren i 100GradFIa og 100GradFIIf ytterst i pektinet, mens glukuronsyren er bundet innerst og/eller forgrenet i disse to fraksjonene. Analyser på bindingsforhold viste at AG-I og AG-II områdene var redusert i 100GradFIa etter enzymatisk degradering. Trolig er

disse to områdene ansvarlig for den komplementfikserende aktiviteten i denne fraksjonen. 100GradFIIb fikk etter enzymdegradering noe reduksjon i arabinan og homogalakturonan. Man tenker seg at områdene med arabinan i denne fraksjonen kan utvise antikomplementær aktivitet, mens reduksjonen i glatte områder ikke var tilstrekkelig stor for å ha effekt på bioaktiviteten.

Kildeliste

- Aarnes, H. (2000) *Planteanatomi Celleveggen-forutsetning for turgortrykk*, <http://www.bio.uio.no/plfys/haa/anatomi/vegg.htm#Cellevegg>, aksessert 12.04.2010.
- Albrecht, C., Theron, E., et al (1995) *Morphological characterisation of the cell-growth inhibitory activity of rooperol and pharmacokinetic aspects of hypoxoside as an oral prodrug for cancer therapy*, The South African medical journal, 85(9), s. 853-860.
- Amersham Biosciences (2000) *ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)*, Følgeshefte.
- Austarheim, I. (2007) *Metoder* I Biologisk aktive polysakkarider fra *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC II. Ethnopharmacological survey in Mali, Universitetet i Oslo, s. 39.
- Bayley, A. og Staden, J. (1990) *Is the corn site of hypoxoside biosynthesis in Hypoxis hemerocallidea?*, Plant Physiology Biochemistry, 28(6), s.691-695.
- Bisby, F., Roskov, Y., et al (2009) *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2009 Annual Checklist*, <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2009/>, 22.01.2010.
- Bouic, P., Etsebeth, S., et al (1996) *Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination*, International Journal of Immunopharmacology, 18(12), s. 693-700.
- Boukes, G. og Van de Venter, M. (2008) *Quantitative and qualitative analysis of sterols/sterolins and hypoxoside contents of three Hypoxis (African potato) spp.*, African Journal of Biotechnology, 7(11), s. 1624-1629.
- Brummer, Y. og Cui, S. (2005) *Understanding Carbohydrate Analysis* I Food Carbohydrates, Red.: Cui, S., Taylor & Francis group, s. 68-104.
- Büchi Labortechnik AG (2010) *Rotavapor® R-210/R-215*, http://www.buchi.com/rotary-evaporator_rotavapor.4695.0.html, aksessert 11.01.2010.
- Chambers, R. og Clamp, J. (1971) *An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials*, Biochemical Journal, 125(4), s. 1009-1018.
- Chennells, G. (2005) *Zulu Medicinal plants*, <http://www.eshowe.com/article/articleview/75/1/21/function.mysql-pconnect>, aksessert 08.04.2010.
- Ciucanu, I. og Kerek, F. (1984) *A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates*, Carbohydrate Research, 131(2), s. 209-217.
- Delves, P. (2008) *Complement System*, <http://www.merck.com/mmpe/sec13/ch163/ch163d.html>, aksessert 14.04.2010.
- Departement Chemie der Universität Basel (2010) http://www.chemie.unibas.ch/~nachwuchs/chemie/modul2_4.html, aksessert 28.01.2010.
- Drewes, S. og Elliot, E. (2008) *Hypoxis hemerocallidea-not merely a cure for benign prostate hyperplasia*, Journal of Ethnopharmacology, 119, s. 593-598.

- Dubois, M., Gilles, K, et al (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Analytical Chemistry 28, s. 350-356.
- Freeze dryer systems europe (2010) The lyophilization specialists in Europe, http://www.freeze-dryers.eu/?gclid=CONjl_GsnZ8CFQIt3godclU6Cw, aksessert 11.01.2010.
- Gaidamashvili, M. og Van Staden, J. (2006) Prostaglandin inhibitory activity by lectin-like proteins from South African medicinal plants, South African Journal of Botany, 72, s. 661-663.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB (2007a) Gel Filtration Principles and Methods, [http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/226C564DBB7D5229C1257628001CD36F/\\$file/18102218AJ.pdf](http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/226C564DBB7D5229C1257628001CD36F/$file/18102218AJ.pdf), aksessert 21.01.2010.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB (2007b) PD-10 Desalting Columns, Følgeshefte.
- GE Healthcare (2010) ÄktaFPLC, http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01399.nsf/Content/laboratory_support~laboratory_flowpathschemes~system_finder~akta_fplc~akta_fplc, aksessert 07.02.2010.
- Greibokk, T. (2005) Ionebytterkromatografi I Kromatografi, Red.: Greibokk, T., Lundanes, E., et al, Universitetsforlaget, s. 60-79.
- Hutchings, A. (1996) Hypoxis hemerocallidea Fisch. & C.A. Mey I Zulu Medicinal Plants An Inventory, University of Natal Press, s. 55-56.
- Izydorczyk, M. (2005) Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates I Food Carbohydrates, Red.: Cui, S., Taylor & Francis group, s. 2-66.
- Kim, J. og Carpita, N. (1992) Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles, Plant Physiology 98(2), s. 646-653.
- Laporta, O., Funes, L. et al (2007) Role of membranes on the antibacterial and anti-inflammatory activities of the bioactive compounds from Hypoxis rooperi corm extract, Archives of Biochemistry and Biophysics, 467 (1), s. 119-131.
- Maaske, L. (2000) T-cell Versus B-cell Immune response, <http://www.medimagery.com/physiology/immunity.html>, aksessert 14.04.2010.
- Mahomed, I. og Ojewole J. (2003) Hypoglycemic effect of Hypoxis hemerocallidea corm (African potato) aqueous extract in rats, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 25(8), s. 617-623.
- Matsabisa, M. (2006) Hypoxis radix, <http://www.sahealthinfo.net/traditionalmeds/monographs/hypoxis.htm>, aksessert 23.01.2010.
- Michaelsen, T., Gilje, A., et al (2000) Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of Plantago major L., Scandinavian Journal of Immunology, 52(5), s. 483-490.
- Mills, E., Cooper, C., et al (2005) African herbal medicines in the treatment of HIV: Hypoxis and Sutherlandia. An overview of evidence and pharmacology, Nutrition Journal, 4(1), s. 19-24.

- Mort, A. og Moerschbacher, B. (1991) Problems encountered during the extraction, purification, and chromatography of pectic fragments, and some solutions to them, Carbohydrate Research, 215, s. 219-227.
- Musabayane, C., Xozwa, K. et al (2005) Effects of Hypoxis hemerocallidea (Fisch. & C.A. Mey.) [Hypoxidaceae] Corm (African Potato) Aqueous Extract on Renal Electrolyte and Fluid Handling in the Rat, Renal Failure, 27, s. 763-770.
- Nair, V., Foster, B., et al (2007) In vitro evaluation of human cytochrom P450 and P-glycoprotein-mediated metabolism of some phytochemicals in extracts and formulations of African potato, Phytomedicine, 14, s. 498-507.
- Nyinawumuntu, A., Awe, E. et al (2008) Uterolytic effect of Hypoxis hemerocallidea Fisch. & C.A. Mey. (Hypoxidaceae) corm ['African Potato'] aqueous extract, Journal of Smooth Muscle Research, 44(5), s. 167-176.
- Ojewole, J. (2006a) Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic properties of Hypoxis hemerocallidea Fisch. & C.A. Mey (Hypoxidaceae) corm ['African Potato'] aqueous extracts in mice and rats, Journal of Ethnopharmacology, 103, s. 126-134.
- Ojewole, J. (2006b) Some in vitro and in vivo cardiovascular effects of Hypoxis hemerocallidea Fisch & CA Mey (Hypoxidaceae) corm (African potato) aqueous extract in experimental animal models, Cardiovascular Journal of South Africa, 17(4), s. 166-171.
- Ojewole, J. (2008) Anticonvulsant activity of Hypoxis hemerocallidea Fisch. & C. A. Mey. (Hypoxidaceae) corm ('African potato') aqueous extract in mice, Phytotherapy research, 22, s. 91-96.
- Owira, P. og Ojewole, J. (2009) 'African potato' (Hypoxis hemerocallidea corm): a plant-medicine for modern and 21st century diseases of mankind? - a review, Phytotherapy research, 23, s. 147-152.
- Parham, P. (2009) Elements of the Immune System and their Roles in Defence I The immune system, Taylor & Francis Group, s. 1-30.
- Paulsen, B. og Barsett, H. (2005) Bioactive Pectic Polysaccharides I Polysaccharides I Advances in Polymer Science, Red.: Heinze, T., Springer, s.69-101.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K., (2004a) Gasskromatografi I Legemiddelanalyse, Fagbokforlaget, s. 193-211.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K., (2004b) UV-spektroskopi I Legemiddelanalyse, Fagbokforlaget, s. 93-108.
- Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M., et al (2003) A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function, Biochimie, 85, (1-2), s.109-121.
- Promega Corporation (2009) Griess Reagent System, www.promega.com/tbs/tb229/tb229.pdf, aksessert 22.03.2010.
- Saha, B. og Bothast, J. (1999), United states Patent, <http://www.freepatentsonline.com/5882905.pdf>, aksessert 20.02.2010.

- Samuelsson, G. og Bohlin, L. (2009) *Carbohydrates* I Drugs of Natural Origin, Kristianstads Boktryckeri AB, s. 148-193.
- Schepetkin, I. og Quinn, M. (2006) *Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential*, International Immunopharmacology 6(3), s. 317-333.
- Schols, H. og Voragen, A. (2002), *The chemical structure of pectins* I Pectins and their Manipulation, Red.: Seymour, G. og Knox, J., Blackwell Publishing, s.1-29.
- Singh, Y. (2004) *Hypoxis L.*, <http://www.plantzafrika.com/planthij/hypoxis.htm>, aksessert 24.01.2010.
- Spectrum® Laboratories Inc (2010) *Fundamentals of Membrane Dialysis*, <http://www.spectrapor.com/dialysis/Fund.html>, aksessert 01.02.2010.
- Smidsrød, O., Haug, A., et al (1966) *The Influence of pH on the Rate of Hydrolysis of Acidic Polysaccharides* I Acta Chemica Scandinavica, Volum 20, Red.: Myrbäck, K., Ballhausen, C., et al, Frenckellin Kirajapaino Osaakeyhtiö, s. 1026-1034.
- Steenkamp, V., Gouws, M., et al (2006) *Studies on antibacterial, anti-inflammatory and anti-oxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia*, Journal of Ethnopharmacology, 103, s. 71–75.
- Sveaas, A. (2007), *Metoder* I Immunmodulerende polysakkarider isolert fra Biophytum petersianum Klotzsch. Etnofarmakologiske studier i Mali, Universitetet i Oslo, s. 56.
- Sweeley, C., Bentley, R., et al (1963) *Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances*, Journal of the American Chemical Society, 85(16), s. 2497–2507.
- Taiz, L. og Zeiger, E. (2006), *Cell Walls: Structure, Biogenesis, and Expansion* I Plant Physiology, Sauer Associates, s 350-374.
- Van Wyk, B. (2008) *A broad review of commercially important southern African medicinal plants*, Journal of Ethnopharmacology, 119, s.342–355.
- Van Wyk, B. (2009) *Hypoxis hemerocallidea* I Medicinal Plants of South Africa, Briza Publications, s.178-179.
- Wang, Q. og Cui, S. (2005) *Understanding the Physical Properties of Food Polysaccharides* I Food Carbohydrates, Red.: Cui, S., Taylor & Francis group, s. 162-218.
- Widmaier, E., Raff, H., et al (2008) *Defense Mechanisms of the Body* I Vander's Human Physiology, McGraw-Hill Higher Education, s. 647-683.
- Wikipedia (27.03.2010) *Cell wall*, http://en.wikipedia.org/wiki/Plant_cell_wall, aksessert 28.03.2010.
- Yamada, H. og Kiyohara, H. (1999) *Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs* I Immunomodulatory Agents from Plants, Red.: Wagner, H., Birkhauser Verlag, s. 161–202.
- Yamada, H. og Kiyohara, H. (2007), *Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structures* I Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology, Red.: Kamerling, J., Boons, G., et al, Elsevier, s.664-671.